

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Rosemary Vuković

**Učinak inducibilne ekspresije gena *crypt* na
sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski
status transgenog korijenja ukrasne koprive
(*Coleus blumei* Benth.)**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković u Zagrebu
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij
Molekularne bioznanosti

Rosemary Vuković

**Učinak inducibilne ekspresije gena *crypt* na
sintezu fenolnih spojeva i antioksidacijski
status transgenog korijenja ukrasne koprive
(*Coleus blumei* Benth.)**

Doktorski rad predložen
Sveučilišnom Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne
doktorske studije
u svrhu stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti na
Sveučilišnom poslijediplomskom interdisciplinarnom
doktorskom studiju Molekularne bioznanosti - modul biologija

Osijek, 2013.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UČINAK INDUCIBILNE EKSPRESIJE GENA *CRYPT* NA SINTEZU FENOLNIH SPOJEVA I ANTIOKSIDACIJSKI STATUS TRANSGENOG KORIJENJA UKRASNE KOPRIVE (*Coleus blumei* BENTH.)

Rosemary Vuković

Rad je izrađen na: Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu
Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izvanredni profesor
Dr. sc. Nataša Bauer, docent

Kratki sažetak doktorskog rada: Svojstvo biotičkih elicitora da potiču obrambeni odgovor biljke koristi se kao strategija za povećanje proizvodnje komercijalno važnih spojeva te u svrhu povećanja otpornosti biljaka na patogene i druge okolišne stresne čimbenike. Beta-kriptogein je oomicetalni elicitor, kodiran genom *crypt*, koji u biljaka izaziva hipersenzitivni odgovor i sustavno stjecanje otpornosti. Cilj ovog rada bio je uzgojiti transgeno korijenje ukrasne koprive, u kojem se gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora, te na taj način kontroliranom sintezom β -kriptogeina u korijenju oponašati napad patogena. Ekspresija β -kriptogeina uzrokovala je značajno smanjenje sadržaja ukupnih topljivih fenola i ružmarinske kiseline (RA) u linijama transgenog korijenja, ali je poticala sekreciju ukupnih topljivih fenola, RA i kavene kiseline iz tkiva u hranjivu podlogu. Osim toga, inducibilna ekspresija β -kriptogeina povećala je aktivnosti antioksidacijskih enzima. Dobiveni rezultati razjašnjavaju fiziologiju obrane biljke nakon infekcije oomicetama te ukazuju na moguću primjenu endogeno sintetiziranog β -kriptogeina u regulaciji sekrecije značajnih sekundarnih metabolita.

Broj stranica: 144

Broj slika: 31

Broj tablica: 5

Broj literaturnih navoda: 236

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: antioksidacijski status, *Coleus blumei*, fenolni spojevi, kavena kiselina, β -kriptogein, oksidacijski stres, ružmarinska kiselina, transgeno korijenje

Datum obrane: 17. travnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Tihana Teklić, redovita profesorica
2. Dr. sc. Mirna Ćurković Perica, izvanredna profesorica
3. Dr. sc. Nataša Bauer, docentica
4. Dr. sc. Elizabeta Has-Schön, redovita profesorica
5. Dr. sc. Mirta Tkalec, docentica
6. Dr. sc. Ivna Štolfa, docentica

Rad je pohranjen u: Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek;
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular Biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

EFFECT OF INDUCIBLE *CRYPT* EXPRESSION ON PHENOLICS SYNTHESIS AND ANTIOXIDATIVE STATUS OF PAINTED NETTLE (*Coleus blumei* BENTH.) TRANSGENIC ROOTS

Rosemary Vuković

Thesis performed at: Faculty of Science, University of Zagreb
Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: Ph. D. Mirna Ćurković Perica, Associate Professor
Ph. D. Nataša Bauer, Assistant Professor

Short abstract: The property of biotic elicitors to induce plant defence response is used as a strategy for enhancing production of commercially important compounds, and to improve plant resistance to pathogens and to some environmental stresses. Oomycetal elicitor coded by the *crypt* gene, β -cryptogein, induces hypersensitive response and systemic acquired resistance against some pathogens. The aim of this study was to generate *Coleus blumei* hairy roots, carrying *crypt* transgene under the control of inducible promoter, and thus through controlled expression of β -cryptogein, mimic the pathogen attack. Induced expression of β -cryptogein caused significant decrease of soluble phenolics and rosmarinic acid (RA) in hairy root lines and increase in secretion of phenolics, RA and caffeic acid from tissue to the culture medium. Further, inducible expression of β -cryptogein in transgenic roots increased activities of antioxidative enzymes. These data elucidate the physiology of plant's defense after oomycetal infection and point out the regulatory potential of endogenously synthesized β -cryptogein in the secretion of valuable secondary metabolites.

Number of pages: 144

Number of figures: 31

Number of tables: 5

Number of references: 236

Original in: Croatian

Key words: Antioxidative status, Caffeic acid, *Coleus blumei*, β -cryptogein, Oxidative stress, Phenolics, Rosmarinic acid, Transgenic roots

Date of the thesis defense: 17th April 2013.

Reviewers:

1. Ph. D. Tihana Teklić, Full Professor
2. Ph. D. Mirna Ćurković Perica, Associate Professor
3. Ph. D. Nataša Bauer, Assistant Professor
4. Ph. D. Elizabeta Has-Schön, Full Professor
5. Ph. D. Mirta Tkalec, Assistant Professor
6. Ph. D. Ivna Štolfa, Assistant Professor

Thesis deposited in: City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorski rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju, Zavodu za mikrobiologiju i Zavodu za botaniku s Botaničkim vrtom Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (Sveučilište u Zagrebu) te na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod mentorstvom prof. dr. sc. Mirne Ćurković Perica i doc. dr. sc. Nataše Bauer.

Zahvala

Ovom prilikom želim od srca zahvaliti svojim dragim mentoricama prof. dr. sc. Mirni Ćurković Perica i doc. dr. sc. Nataši Bauer prije svega na ukazanom povjerenju, a zatim na stručnom vodstvu, podršci i vremenu koje su mi posvetile tijekom mog znanstveno-istraživačkog rada i izradi ove dizertacije.

... veliko hvala profesorici Ćurković na svim idejama i danim savjetima, na nesebično prenesenom bogatom znanju i iskustvu posebno u pismenom znanstvenom izražavanju.

... veliko hvala docentici Bauer na pomoći i korisnim savjetima u eksperimentalnom radu, nesebično prenešenom praktičnom i laboratorijskom znanju i iskustvu. Hvala što svojim entuzijazmom i u meni potiče istraživački duh

Najiskrenije zahvaljujem prof. dr. sc. Elizabeti Has-Schön na ukazanom povjerenju tijekom mog zaposlenja, zatim na nesebičnoj podršci i razumjevanju tijekom mojih odlazaka u Zagreb, te na brojnim savjetima i prenesenom znanju.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Mirti Tkalec na velikoj pomoći i savjetima tijekom savladavanja rada na HPLC-u, kao i na pažljivom čitanju teksta doktorskog rada te korisnim prijedlozima za njegovo poboljšanje.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Tihani Teklić na pregledu doktorskog rada te korisnim savjetima za poboljšanje kakvoće ovog doktorskog rada.

Veliko hvala Ivni prije svega na prijateljstvu i podršci, a zatim na nesebičnoj pomoći u eksperimentalnom radu, te brojnim konstruktivnim prijedlozima i savjetima.

Veliko hvala svim prijateljima na podršci, ohrabrivanju i razumjevanju, a koji su kroz svoje nesebično prijateljstvo u ovaj doktorat ugradili dio sebe.

Neizmjereno samzahvalna onima bez čije ljubavi, podrške i pomoći ne bi ni bilo ovoga rada – mojoj obitelji i Alenu.

... veliko hvala braći Josipu i Adamu te sestri Ani koji su mi oslonac bili i ostaju tijekom čitavog života. Sretna sam što vas imam!!!

... posebno hvala mojim dragim roditeljima na bezuvjetnoj ljubavi, podršci, svim odricanjima i razumjevanju te na cjelokupnom trudu koji su nesebično uložili u moje obrazovanje.

Najveću zahvalnost želim izraziti Alenu uz čiju je ljubav, podršku i pomoć cjelokupna izrada doktorskog rada bila neopisivo jednostavnija. Hvala na razumjevanja, beskrajnoj toleranciji i strpljenju...

Rosemary Vuković

POPIS KRATICA

| | |
|-------------------------|---|
| AA/Bis | Akrilamid/bisakrilamid |
| AlcA | Promotor alkohol dehidrogenaze |
| alcR | Gen za transkripcijski faktor AlcR |
| ANOVA | Analiza varijance |
| APS | Amonijev persulfat |
| APX | Askorbat-peroksidaza |
| bp | Parovi baza (engl. <i>base pairs</i>) |
| BSA | Albumin goveđeg seruma (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| CAF | Kavena kiselina (engl. <i>Caffeic acid</i>) |
| 35S CaMV | Konstitutivni promotor gena za 35S RNA virusa mozaika cvjetače |
| CAT | Katalaza |
| CBBG | Coomassie briljant plavo G-250 (engl. <i>Coomassie Brilliant Blue</i>) |
| cDNA | DNA komplementarna mRNA |
| crypt | Gen za β -kriptogein |
| DEPC | Dietil-pirokarbonat |
| dH₂O | Destilirana voda |
| diH₂O | Deionizirana voda |
| dNTP | Deoksiribonukleotidi |
| EDTA | Etilendiamintetraoctena kiselina |
| FC | Folin-Ciocalteau reagens |
| GA | Galna kiselina |
| GAE | Ekvivalenti galne kiseline |
| GI | Indeks rasta (engl. <i>Growth Index</i>) |
| GPOD | Gvajakol-peroksidaza |
| HPLC | Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| HR | Hipersenzitivni odgovor (engl. <i>Hypersensitive Response</i>) |
| hpr | Gen za 4-hidroksifenilpiruvat-reduktazu |
| KP | Kalij-fosfatni pufer |
| LB podloga | Hranjiva podloga Lauria Bertani |
| LB | Lijeve rubne sekvence T-DNA |
| LPO | Razina lipidne peroksidacije |
| MDA | Malondialdehid |
| MMP-9 | metaloproteinaze 9 |
| mqH₂O | Ultra čista voda tvrtke Milipore |
| mRNA | Glasnička RNA |
| MS | Hranjiva podloga Murashige i Skoog |
| MWCO | Mjera za veličinu pora na membrani (engl. <i>Molecular Weight Cut Off</i>) |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani |
| NBT | Nitro plavi tetrazolij (engl. <i>NitroBlue Tetrazolium</i>) |
| NOX | NADPH-oksidaza |
| nptII | Gen za neomicin-fosfotransferazu II |
| ORF | Otvoreni okviri čitanja (engl. <i>open reading frames</i>) |
| PAL | Fenilalanin-amonij-lijaza |
| PCR | Lančana reakcija polimerazom (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| Phe | Fenilalanin |
| PVPP | Polivinil-polipirolidon |
| RA | Ružmarinska kiselina (engl. <i>Rosmarinic Acid</i>) |

| | |
|-----------------|--|
| RB | Desna rubna sekvenca T-DNA |
| Ri | Plazmid koji inducira rast kosmatog korijenja (engl. <i>Root inducing</i>) |
| ROS | Reaktivne kisikove jedinice (engl. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| RNaza A | Ribonukleaza A |
| RT | Obrnuto prepisivanje (engl. <i>Reverse Transcription</i>) |
| RT-PCR | Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja |
| SAR | Sustavno stečena otpornost (engl. <i>Systemic Acquired Resistance</i>) |
| SD | Standardna devijacija |
| SDS | Natrijev dodecil sulfat (engl. <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>) |
| SDS-PAGE | Natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforeza (engl. <i>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| SOD | Superoxid-dismutaza |
| SPE | Ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>Solid Phase Extraction, SPE</i>) |
| sv.tv. | Svježa tvar |
| TAE | Tris-acetatni/EDTA pufer |
| tat | Gen za tirozin-aminotransferazu |
| TBA | Tiobarbiturna kiselina |
| TBARS | Reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline (engl. <i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>) |
| TBE | Tris-boratni/EDTA pufer |
| TCA | Trikloroctena kiselina |
| T-DNA | dio plazmidne DNA koji se integrira u biljni genom (engl. <i>transferred DNA</i>) |
| TEMED | Tetrametiletildiamin |
| tnos | Terminator nopalina sintetaze |
| Tris | 2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol |
| Tyr | Tirozin |
| UV | Ultraljubičasta svjetlost |
| VIS | Vidljiva svjetlost |
| WT | Divlji tip (engl. <i>Wild Type</i>) |
| YEP | YEP (engl. <i>Yeast Extract Peptone</i>) hranjiva podloga |

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. Ukrasna kopriwa (<i>Coleus blumei</i> Benth.)..... | 2 |
| 1.2. Fenolni spojevi..... | 5 |
| 1.2.1. Kavena i ružmarinska kiselina | 8 |
| 1.3. Kultura kosmatog korijenja..... | 10 |
| 1.4. Biotički elicitori | 14 |
| 1.4.1. Beta-kriptogein..... | 15 |
| 1.5. Inducibilni promotor reguliran alkoholom..... | 17 |
| 1.6. Reaktivne kisikove jedinke i oksidacijski stres | 18 |
| 1.6.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa | 19 |
| 1.6.1.1. Vodikov peroksid | 19 |
| 1.6.1.2. Lipidna peroksidacija | 20 |
| 1.7. Antioksidacijski sustav biljne obrane | 21 |
| 1.7.1. Superoksid-dismutaza | 21 |
| 1.7.2. Katalaza..... | 22 |
| 1.7.3. Gvajakol-peroksidaze..... | 23 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA | 24 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 26 |
| 3.1. Materijali..... | 27 |
| 3.1.1. Kemikalije | 27 |
| 3.1.2. Komercijalni kompleti i proteini | 29 |
| 3.1.3. Standardi duljine odsječaka DNA i molekularne mase..... | 29 |
| 3.1.4. Oligonukleotidne početnice..... | 29 |
| 3.1.5. Hranjive podloge | 30 |
| 3.1.5.1. Hranjiva podloga po Murashige i Skoog-u..... | 30 |
| 3.1.5.2. Bakterijske hranjive podloge | 32 |
| 3.1.6. Biljni materijal..... | 32 |
| 3.1.7. Bakterije | 33 |
| 3.2. Metode | 35 |
| 3.2.1. Tretman rekombinantnim β -kriptogeinom | 35 |
| 3.2.2. Transformacija lisnih eksplantata ukrasne kopriwe i indukcija transgenog korijenja..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.2.3. Kultura biljnog tkiva | 36 |
| 3.2.4. Izdvajanje plazmidne DNA iz bakterije <i>A. rhizogenes</i> | 36 |
| 3.2.5. Izdvajanje genomske DNA iz tkiva transgenog korijenja..... | 37 |
| 3.2.6. Lančana reakcija polimerazom..... | 37 |
| 3.2.7. Određivanje količine i kakvoće DNA | 38 |
| 3.2.8. Indukcija sinteze β -kriptogeina u transgenom korijenju | 39 |
| 3.2.9. Izdvajanje ukupne glasničke RNA iz tkiva transgenog korijenja | 40 |
| 3.2.10. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja..... | 40 |
| 3.2.11. Semi-kvantitativni RT-PCR | 41 |
| 3.2.12. Bioinformatička analiza | 42 |
| 3.2.13. Koncentriranje izvanstaničnih proteina..... | 42 |
| 3.2.14. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu | 43 |
| 3.2.15. Bojenje gelova srebrovim nitratom | 44 |
| 3.2.16. Određivanje indeksa rasta transgenog korijenja..... | 45 |
| 3.2.17. Priprema metanolnog ekstrakta i određivanje ukupnih topljivih fenola u tkivu i tekućoj hranjivoj podlozi..... | 45 |
| 3.2.18. Ekstrakcija na čvrstoj fazi | 46 |
| 3.2.19. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti | 46 |
| 3.2.20. Fluorescentna mikroskopija | 47 |
| 3.2.21. Antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive | 47 |
| 3.2.21.1. Određivanje količine vodikova peroksida | 49 |
| 3.2.21.2. Određivanje količine malondialdehida..... | 49 |
| 3.2.21.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina | 50 |
| 3.2.21.4. Određivanje koncentracije proteina..... | 50 |
| 3.2.21.5. Određivanje aktivnosti NADPH-oksidade..... | 51 |
| 3.2.21.6. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze..... | 51 |
| 3.2.21.7. Određivanje aktivnosti katalaze..... | 52 |
| 3.2.21.8. Određivanje aktivnosti nespecifičnih gvajakol-peroksidaza | 52 |
| 3.2.22. Statistička obrada podataka..... | 53 |
| 4. REZULTATI..... | 54 |
| 4.1. Učinak β -kriptogeina na sadržaj ukupnih topljivih fenola u tkivu i hranjivoj podlozi kosmatog korijenja ukrasne koprive | 55 |
| 4.2. Uspostavljanje kulture transgenog korijenja ukrasne koprive | 56 |
| 4.3. Gen <i>crypt</i> u transgenom korijenju ukrasne koprive..... | 58 |

| | |
|--|------------|
| 4.4. Ekspresija gena <i>crypt</i> u transgenom korijenju ukrasne koprive | 60 |
| 4.5. Bioinformatičko predviđanje stanične lokalizacije β -kriptogeina | 62 |
| 4.6. Izvanstanični proteini u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja..... | 64 |
| 4.7. Učinak ekspresije gena <i>crypt</i> na rast transgenog korijenja ukrasne koprive | 66 |
| 4.8. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u transgenom korijenju ukrasne koprive | 68 |
| 4.9. Izlučivanje fenolnih spojeva iz tkiva u hranjivu podlogu transgenog korijenja | 70 |
| 4.10. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive | 72 |
| 4.11. Sadržaj kavene kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive | 75 |
| 4.12. Sadržaj ružmarinske i kavene kiseline u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja ukrasne koprive..... | 77 |
| 4.13. Autofluorescencija fenolnih spojeva <i>in vivo</i> | 79 |
| 4.14. Oksidacijski/antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive..... | 81 |
| 4.14.1. Količina vodikovog peroksida u transgenom korijenju ukrasne koprive..... | 81 |
| 4.14.2. Razina lipidne peroksidacije u transgenom korijenju ukrasne koprive..... | 81 |
| 4.14.3. Aktivnost NADPH-oksidaze u transgenom korijenju ukrasne koprive | 84 |
| 4.14.4. Aktivnost superoksid-dismutaze u transgenom korijenju ukrasne koprive | 86 |
| 4.14.5. Aktivnost katalaze u transgenom korijenju ukrasne koprive | 88 |
| 4.14.6. Aktivnost gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive | 90 |
| 5. RASPRAVA | 92 |
| 5.1. Utjecaj genetičke elicitacije na sintezu fenolnih spojeva u transgenom korijenju ukrasne koprive..... | 93 |
| 5.2. Utjecaj genetičke elicitacije na antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive | 101 |
| 6. ZAKLJUČCI..... | 107 |
| 7. LITERATURA | 111 |
| 8. SAŽETAK..... | 134 |
| 9. SUMMARY | 137 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 140 |
| 11. POPIS RADOVA..... | 142 |

1. UVOD

Fenolni spojevi čine vrlo raznoliku skupinu biološki aktivnih tvari koji svojim djelovanjem kao antioksidansi smanjuju rizik od pojave tumora, kroničnih i krvožilnih bolesti (Fraga 2010). Veliki farmakološki značaj fenolnih spojeva vodio je ka brojnim istraživanjima koja uključuju njihovu sintezu u kulturi *in vitro*. Posebno su značajne kulture kosmatog korijenja zbog svoje genetičke i biokemijske stabilnosti, visoke stope rasta te sinteze sekundarnih metabolita u istoj ili u većoj količini u odnosu na samu biljku (Georgiev i sur. 2007). Akumulacija fenolnih spojeva u biljkama se često javlja kao dio obrambenog odgovora biljke na stres i napad patogena. Kako bi se povećala sinteza fenola i istražila njihova fiziološka uloga, različite su strategije korištene u biljnim kulturama *in vitro*. Budući da biotički elicitori potiču obrambeni odgovor biljke, često se koriste u *in vitro* proizvodnji važnih sekundarnih metabolita. Osim toga, tretmani biotičkim elicitorima se često koriste i za povećanje otpornosti biljaka na patogene ali i na druge okolišne stresne čimbenike. Uslijed napada patogena dolazi do sinteze reaktivnih kisikovih jedinica (ROS) čije nakupljanje u stanicama može izazvati oksidacijski stres. Kako bi spriječile štetne učinke ROS-a, biljke su razvile antioksidacijske obrambene mehanizme koji uključuju indukciju antioksidacijskih enzima.

Fitopatogena oomiceta *Phytophthora cryptogea* secernira proteinski elicitor β -kriptogein, koji u biljaka može izazvati hipersenzitivni odgovor (HR) i sustavno stjecanje otpornosti (SAR). Cilj ovog rada je uzgojiti transgeno korijenje ukrasne koprive u kojem se gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog alkoholnog promotora te na taj način kontroliranom sintezom β -kriptogeina u korijenju oponašati napad patogena. Ovo istraživanje će odrediti utjecaj endogeno sintetiziranog β -kriptogeina na sintezu i sekreciju ukupnih fenolnih spojeva, ružmarinske (RA) i kavene (CAF) kiseline te na antioksidacijski status transgenog korijenja.

1.1. Ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.)

Ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.) pripada porodici usnača (*Lamiaceae*) koja je poznata po velikom broju ljekovitog i začinskog bilja (Slika 1). Latinski naziv roda *Coleus* dolazi od grčke riječi „koleus“ što znači plašt, a naziv proizlazi iz spajanja muških dijelova cvijeta u plašt ili cijev. Naziv „*blumei*“ ukrasna je kopriva dobila prema nizozemskom piscu Karlu Ludwigu Blumeu koji je tijekom svojeg života dosta pisao o biljkama s indonezijskog otoka Java. Prema novijoj klasifikaciji ukrasna je kopriva

smještena u rod *Solenostemon*, s latinskim nazivom vrste *Solenostemon scutellarioides*. U svojem prirodnom staništu ukrasna kopriva je višegodišnja biljka. Porijeklom je iz jugoistočne Azije, Australije, Istočne Indije, Indonezijskog arhipelaga i Filipina (Prajapati i sur. 2003). Ova biljka najviše je poznata kao dekorativna vrsta zbog svojih brojnih kultivara koje krasi šareni, sitno nazubljeni srcoliki listovi. Listovi se pojavljuju u raznim bojama, od žute do purpurne, od zelene do kestenjaste i crvene tvoreći pruge, pjege ili koncentrične zone. Osim kao dekorativna biljka, ukrasna je kopriva značajna i kao ljekovita biljka (Ong i Norzalina 1999). Biljke roda *Coleus* su od davnina korištene u tradicionalnoj medicini Indije (*Ayurveda*). Tako se biljkama roda *Coleus* pridaju mnoga ljekovita obilježja kao što su npr. antitumorsko, antidepresivno, antidiuretsko, antispazmodično i bronhodilatatorsko djelovanje (Duke i sur. 2002, Khan i sur. 2012). Ljekoviti pripravci listova primjenjuju se za liječenje glavobolje, povišene temperature, angine, astme, psorijaze (Morton 1992, Khory i Katrak 1999). Osim toga, neke vrste roda *Coleus* koriste se u prehrani kao začini različitim jelima kao npr. vrsta *Coleus aromaticus*. Ljekovita svojstva ove biljke imaju zahvaljujući velikoj količini fenolnih spojeva koje sadrže. Rezultati istraživanja etanolnih ekstrakata triju vrsta roda *Coleus* pokazuju kako su ove biljke važan izvor fenolnih spojeva (polifenola, tanina, flavona i flavonola) sa značajnom antioksidacijskom i antibakterijskom aktivnošću (Rasineni i sur. 2008). Slični rezultati dobiveni su analizom ekstrakata dvaju kultivara ukrasne koprive, koji pokazuju velik udio ukupnih fenola i flavonoida u tkivu ukrasne koprive, u količini jednakoj ili većoj u odnosu na druge ispitivane vrste roda *Coleus*. Osim toga, rezultati istraživanja pokazuju značajnu antioksidacijsku i antimikrobnu aktivnost ekstrakata ukrasne koprive bez toksičnog učinka na miševu (Yahaya i sur. 2010, Khattak i Taher 2011). Odvajanjem i pročišćavanjem (difetil-pikrilhidrazil)-aktivnih sastojaka ekstrakta lista *C. aromaticus* te analizom spektrometrijskim metodama (nuklearnom magnetskom rezonancom i masenom spektrometrijom) identificirana su tri glavna sastojka - ružmarinska kiselina, kavena kiselina i klorogenska kiselina. Mjerenje antioksidacijske aktivnosti izoliranih spojeva potvrđuje da je riječ o izrazito snažnim antioksidacijskim spojevima. Nadalje, identifikacijom i kvantifikacijom izoliranih spojeva pomoću tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) utvrđen je najveći sadržaj ružmarinske kiseline, što upućuje i na mogući značajni doprinos ove fenolne kiseline ukupnoj antioksidacijskoj aktivnosti ekstrakta lista *C. aromaticus* (Kumaran i Karunakaran 2007).



Slika 1. Ukrasna kopriva (*C. blumei* Benth.). Crtež: Louis Benoit van Houtte 1880.

1.2. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su najučestalija i najraširenija skupina sekundarnih biljnih metabolita koji su prisutni u svim biljkama, kao i u svim biljnim organima (u lišću, korijenu, kori drveća, cvijeću, koncentrirani u sjemenkama, pokožici i mezokarpu voća i povrća, žitaricama). Posebno je značajan njihov veliki udio u svim vrstama medicinskog i začinskog bilja. Poznato je više od 8 000 različitih fenolnih spojeva, čiju osnovnu strukturu čini aromatski prsten (C₆) na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina (Croteau i sur. 2000). Većinom se sintetiziraju iz cimetine kiseline, koja nastaje deaminacijom L-fenilalanina u reakciji koju katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza (PAL, EC 4.3.1.5). Enzim PAL povezuje primarni (biosintetski put šikiminske kiseline) sa sekundarnim metabolizmom (fenilpropanoidni biosintetski put) te ima ključnu ulogu u regulaciji sinteze fenolnih sekundarnih metabolita (Hahlbrock i Scheel 1989, Dixon i Paiva 1995, Ryan i sur. 1999). Značenje fenilpropanoidnog biosintetskog puta potvrđuje i činjenica da biljke, u uvjetima normalnog rasta, 20% ugljika fiksiraju ovim putem (Diáz i sur. 2001). Pojam biljni fenoli obuhvaća vrlo veliku i raznoliku skupinu spojeva, stoga u literaturi postoji više različitih klasifikacija fenolnih spojeva prema njihovoj strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, biosintetskog puta kojima nastaju i dr. (Clifford 2001, Vermerris i Nicholson 2008). Jednostavnom su klasifikacijom fenolni spojevi podjeljeni na jednostavne fenole i polifenole. Navedena je klasifikacija temeljena isključivo na broju prisutnih fenolnih podjedinica (Clifford 2001). U literaturi je također usvojena i jednostavna podjela na flavonoide i ne-flavonoidne polifenole (de la Rosa i sur. 2010). Tako fenolni spojevi obuhvaćaju: jednostavne fenole, fenolne kiseline, flavonoide, kumarine, stilbene, tanine i lignine. Ovi se spojevi u biljkama uglavnom javljaju u obliku glikozida ili estera (Harborne 1998). U biljkama fenolni spojevi imaju različite uloge, a sintetiziraju se tijekom njihovog razvoja. Iako nisu esencijalni za rast, razvoj i razmnožavanje biljaka, fenolni spojevi ipak imaju značajnu ulogu u navedenim procesima. Povećana sinteza fenolnih spojeva u biljkama javlja se kao dio obrambenog odgovora biljke na abiotički stres uzrokovan npr. UV-zračenjem, i na biotički stres uzrokovan napadom patogena i oštećenjem tkiva uslijed hranjenja biljojeda (Haslam 1998). Osim što imaju važnu ulogu u indukciji otpornosti u biljaka, djeluju i kao signalne molekule u interakcijama između biljaka i mikroorganizama (Pourcel i sur. 2006, Mandal i sur. 2010).

Budući da su prisutni u svim biljnim organima, biljni fenoli predstavljaju neizostavan dio ljudske prehrane, ali se ne smatraju esencijalnim prehranbenim tvarima s

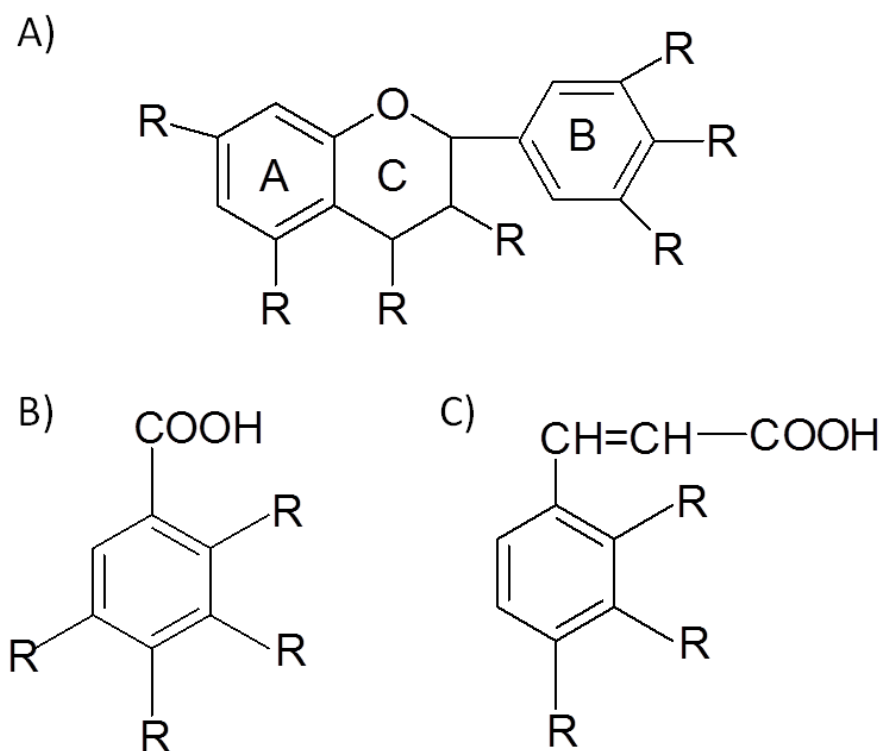
obzirom da njihov nedostatak u organizmu čovjeka nije povezan sa specifičnim poremećajima. Ipak, za mnoge od ovih spojeva dokazano je da posjeduju brojne biološke aktivnosti koje utječu na zdravlje i prevenciju bolesti. Štoviše, neki su fenolni spojevi od davnina poznati kao terapeutici te njihove molekularne strukture predstavljaju osnovu mnogih suvremenih lijekova. U posljednjih se nekoliko godina interes javnosti i znanosti za fenolne spojeve znatno povećao. Razlog tome je učinak koji fenoli imaju na očuvanje zdravlja čovjeka zbog potencijalne antioksidacijske i antimikrobne aktivnosti. Zaštitna uloga fenolnih spojeva u biološkim sustavima pripisuje se njihovoj sposobnosti sparivanja („hvatanja”) elektrona slobodnog radikala, kelatnog vezanja iona prijelaznih metala, aktiviranja antioksidacijskih enzima i inhibiranja oksidaza (Rice-Evans i sur. 1997). Tako, fenolni spojevi zbog svoje izražene antioksidacijske aktivnosti smanjuju rizik od pojave tumora, kroničnih i krvožilnih bolesti (Middleton i Kandaswami 1994, Dai i sur. 2010, Fraga 2010). Fenolnim spojevima pripisuju mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu i na boju i okus hrane (Middleton i Kandaswami 1994). Zbog izražene antimikrobne aktivnosti, preporučuje se upotreba biljnih fenola kao prirodnih konzervansa hrane (Nychas 1995).

Fenolni spojevi se mogu kvalitativno i kvantitativno određivati primjenom različitih tehnika kao što su UV/VIS spektrofotometrija, HPLC, tankoslojna kromatografija, kapilarno-zonska elektroforeza (Stalikas 2007) i drugo.

Flavonoidi su najzastupljeniji fenolni spojevi s istom osnovnom strukturom koju čini difenilpropanski kostur C_{15} ($C_6-C_3-C_6$), odnosno dva benzenska prstena (A i B) povezana s piranskim prstenom (C) koji sadrži kisik (Slika 2A). Flavonoidi se međusobno razlikuju prema stupnju oksidacije centralnog piranskog prstena, izuzev halkona u kojih je piranski prsten otvoren. Mogu biti hidroksilirani, metoksilirani, glikozilirani s monosaharidima ili oligosaharidima, a često su i esterificirani organskim kiselinama. Ovisno o broju i položaju vezanih hidroksilnih skupina, stupnju nezasićenosti i stupnju oksidacije centralnog C-prstena, flavonoidi se dijele u brojne podskupine: antocijanidini, antocijan glikozidi, flavoni, izoflavoni, flavanoni, flavan-3-oli, flavonoli, flavonol glikozidi, procijanidini i dihidrohalkoni. Razlike u strukturi unutar svake podskupine djelomično su posljedica različitog stupnja i obrasca hidroksilacije, metoksilacije, prenilacije ili glikozilacije.

Nakon flavonoida, drugu skupinu po važnosti i zastupljenosti biljnih fenola čine fenolne kiseline (Slika 2B, C). Strukturu fenolnih kiselina čini benzenski prsten povezan s

karboksilnom skupinom (Lafay i Gil-Izquierdo 2008). Na temelju strukture razlikuju se dvije skupine fenolnih kiselina: derivati benzojeve kiseline (hidroksibenzojeve kiseline, C₆-C₁, Slika 2B) i derivati cimetine kiseline (hidroksicimetine kiseline, C₆-C₃, Slika 2C, Robbins i sur. 2003). Najzastupljeniji derivati hidroksibenzojeve kiseline su p-hidroksibenzojeva, vanilinska, galna, protokatehinska, siringinska, gentistinska i elaginska kiselina. Hidroksibenzojeve kiseline mogu nastati direktno iz međuprodukata puta šikiminske kiseline. Međutim, u biljkama češće nastaju degradacijom derivata cimetine kiseline. Manje zastupljenu skupinu fenolnih kiselina čine derivati hidroksifeniloctene kiseline (C₆-C₂ derivati). Najzastupljeniji derivati hidroksicimetine kiseline su kavena, kumarinska, ferulična i sinapinska kiselina. Navedene kiseline čine i međuprodukte u biosintezi lignina (Russell i sur. 1999a). Također predstavljaju važne građevne jedinice mnogih drugih prirodnih spojeva te često dolaze u obliku specifičnih estera kao npr. klorogenska kiselina (Ralph i sur. 1994, Russell i sur. 1999b). Manji dio fenolnih kiselina dolazi u slobodnom obliku, dok je većina fenolnih kiselina u biljkama konjugirana (ponajviše esterifikacijom) sa strukturnim biljnim djelovima (celulozom, proteinima i ligninom) ili s različitim molekulama uključujući jednostavne šećere i organske kiseline.



Slika 2. Osnovne strukture nekih fenolnih spojeva: A) flavonoida (C₆-C₃-C₆); B) hidroksibenzojeve kiseline (C₆-C₁); C) hidroksicimetine kiseline (C₆-C₃).

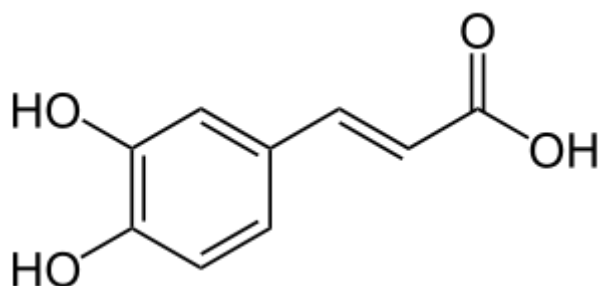
1.2.1. Kavena i ružmarinska kiselina

Glavne aktivne tvari ukrasne koprive su kavena (3,4-dihidroksicimetna kiselina, Slika 3) i ružmarinska (α -*O*-kafeoil-3,4-dihidroksifenilmliječna kiselina, Slika 4) kiselina, koje se zbog svojih značajnih bioloških i farmakoloških svojstava intenzivno istražuju.

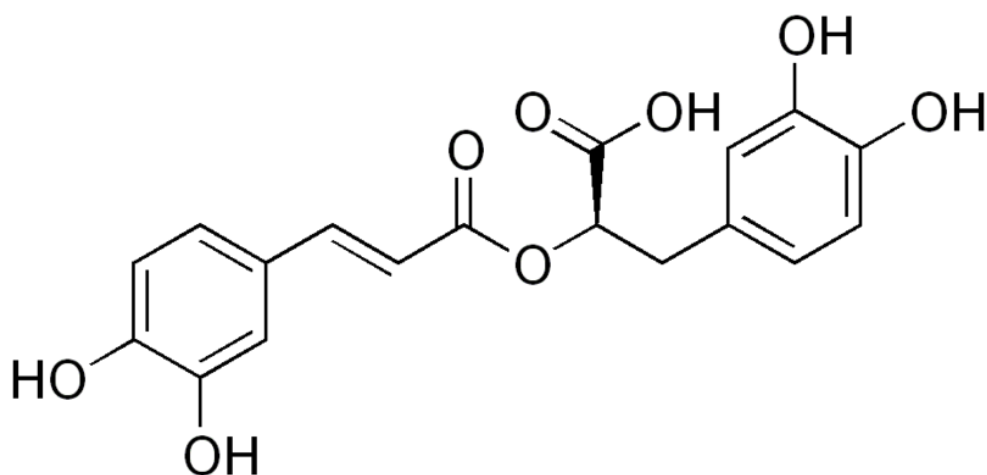
Kavena kiselina jedna je od najučestalijih hidroksicimetnih kiselina koja je prisutna u voću, povrću, žitaricama, mahunarkama i napitcima koje čovjek svakodnevno koristi u prehrani. Prisutna je u svim biljkama budući da predstavlja ključni međuprodukt u biosintezi lignina. Osim što je prisutna u slobodnom obliku, najčešće dolazi u obliku estera s kviničnom kiselinom, pod nazivom klorogenska kiselina (Jiang i sur. 2005). CAF i njeni esteri nalaze se u listovima, cvjetovima i pupovima mnogih ljekovitih biljaka, stoga se smatra da doprinose ljekovitim svojstvima ovih biljaka. Biološke aktivnosti kavene kiseline i njenih estera intenzivno se proučavaju zahvaljujući ulozi u očuvanju zdravlja čovjeka. Kavena kiselina pokazuje veliku antioksidacijsku aktivnost *in vitro* i *in vivo* (van Gadow i sur. 1997, Gülcin 2006, Sato i sur. 2011), hepatoprotektivno (Janbaz i sur. 2004), protuvirusno (Ikeda i sur. 2011), protuupalno (Chao i sur. 2009) djelovanje, a u kombinaciji s ružmarinskom kiselinom i antimikrobno djelovanje (Widmer i Laurent 2006). CAF i njezin derivat, feniletil ester kavene kiseline (CAPE) inhibiraju karcinogenezu. Antitumorski i antimetastatički učinak ovi spojevi ostvaruju supresijom enzimske aktivnosti metaloproteinaza 9 (MMP-9) i supresijom transkripcije MMP-9 putem inhibicije nuklearnog čimbenika kapa B (NF- κ B, Chung i sur. 2004). Protuupalna i protutumorska svojstva također dolaze do izražaja kod zaštite stanica kože izloženih UV zračenju (Staniforth i sur. 2006). CAF učinkovito inhibira aktivnost lipooksigenaze (time i lipidnu peroksidaciju) te na taj način sprječava sintezu leukotriena koji sudjeluju u imunoregulaciji te posreduju u različitim oboljenjima kao što su astma, upalna i alergijska stanja (Iwahashi i sur. 1990, Toda i sur. 1991). CAF smanjuje proizvodnju aflatoksina vrste *Aspergillus flavus* za više od 95%, što omogućava primjenu ovog spoja kao prirodnog protufungicida (Kim i sur. 2008).

Ružmarinska kiselina je ester kavene i 3,4- dihidroksifenilmliječne kiseline. Prvi su je izolirali i pročistili Scarpati i Oriente (1958) te joj dali ime prema ružmarinu (*Rosmarinus officinalis*), biljke iz koje su je izolirali. Nađena je u mnogim vrstama porodice usnača (Lamiaceae) i oštrolista (Boraginaceae), kao i u mnogim drugim vrstama izvan ovih porodica (Petersen i Simmonds 2003). Objavljena su brojna istraživanja koja opisuju širok raspon bioloških aktivnosti RA. Tako, RA pokazuje snažno antioksidativno

(Qiao i sur. 2005, Tepe 2008), antimutageno (Vattem i sur. 2006, Furtado i sur. 2008), antidepresivno (Takeda i sur. 2002), hepatoprotektivno (Osakabe i sur. 2002), protuvirusno (Swarup i sur. 2007) antibakterijsko i antimikotično (Bais i sur. 2002, Widmer i Laurent 2006) djelovanje. Nekoliko je istraživanja potvrdilo i protuupalni učinak RA, čime je omogućena upotreba ove tvari za liječenje različitih upalnih oboljenja. Tako RA zbog svoje antioksidacijske aktivnosti i zbog inhibicije upalnih odgovora predstavlja vrlo učinkovitu terapiju za alergijski rinokonjuktivitis (Osakabe i sur. 2004). Osim toga, pokazuje i antiangiogeni potencijal koji također može biti povezan s njenom antioksidacijskom aktivnošću (Huang i Zheng 2006). Između 50 ispitivanih fenolnih spojeva, RA ima najveći antioksidacijski potencijal za terapijsku primjenu u prevenciji bolesti (Soobrattee i sur. 2005). Velik interes farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije za RA tj. za njezinim biološkim aktivnostima vodio je ka brojnim istraživanjima koja uključuju proizvodnju RA u kulturi *in vitro*. Kulture *in vitro* predstavljaju vrlo obećavajuće biosintetske sustave za proizvodnju značajnih sekundarnih metabolita. Prva stanična kultura koja je akumulirala RA dobivena je iz ukrasne koprive (Zenk i sur. 1977, Razzaque i Ellis 1997). Osim toga, suspenzija stanica ukrasne koprive korištena je kao vrlo podoban sustav za istraživanje biosintetskog puta RA (Petersen 1997). U biosintezi ružmarinske kiseline sudjeluje osam enzima (Petersen 1997). Prekursori u biosintezi su aromatske aminokiseline L-fenilalanin (Phe) i tirozin (Tyr, Ellis i Towers 1970). Prvi korak biosinteze, deaminacija Phe u t-cimetnu kiselinu, katalizira enzim fenilalanin-amonij-lijaza. U staničnoj kulturi ukrasne koprive pojačanoj sintezi RA prethodi pojačana aktivnost enzima PAL. Djelovanjem tri enzima osnovnog fenilpropanoidnog puta (PAL, hidroksilaza cimetne kiseline i ligaza kumarinske kiseline i acetyl-koenzima A) Phe prelazi u aktiviranu kumarinsku kiselinu, dok Tyr nakon reakcije deaminacije i redukcije, koje kataliziraju enzimi tirozin-aminotransferaza i hidroksifenilpiruvat-reduktaza prelazi u 4-hidroksimlječnu kiselinu. Produkt spajanja kumarinske kiseline i 4-hidroksimlječne kiseline (reakciju katalizira sintaza ružmarinske kiseline) hidroksilira se na 3 i 3' mjestu aromatskih prstena pomoću citokrom P450 monooksigenaza te nastaje ružmarinska kiselina (Petersen i sur. 1993, Petersen 1997).



Slika 3. Struktura kavene kiseline (3,4-dihidroksicimetna kiselina).



Slika 4. Struktura ružmarinske kiseline (α -O-kafeoil-3,4-dihidroksifenilmlječna kiselina).

1.3. Kultura kosmatog korijenja

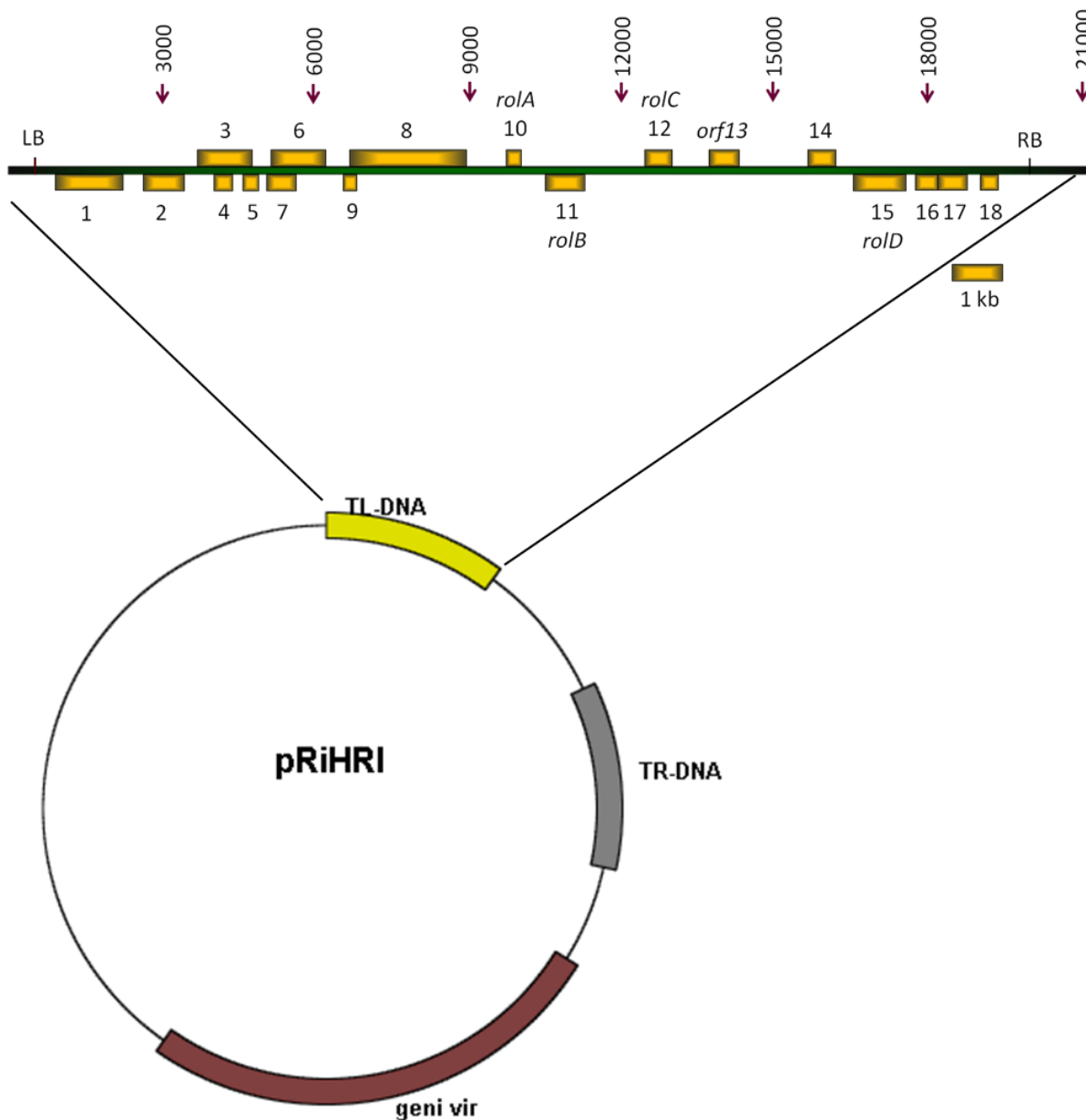
Farmakološki značaj fenolnih spojeva vodio je ka brojnim istraživanjima strategija koje bi doprinijele njihovoj povećanoj sintezi. Tako su kulture *in vitro* pokazale vrlo veliki potencijal za povećanu biosintezu fenolnih spojeva. Posebno su značajne kulture kosmatog korijenja zbog svoje genetičke i biokemijske stabilnosti, visoke stope rasta (bez dodatka regulatora rasta) te sinteze sekundarnih metabolita u istoj ili u većoj količini u odnosu na samu biljku (Flores i sur. 1999, Georgiev i sur. 2007a). Kosmato korijenje nastaje genetičkom transformacijom pomoću bakterije *Agrobacterium rhizogenes*. Bakterije roda *Agrobacterium* su fitopatogene gram negativne bakterije koje žive u tlu, a imaju sposobnost genetičke transformacije biljnih stanica u prirodi, pri čemu uzrokuju nastanak tumora vrata korijena (engl. *crown gall*, *Agrobacterium tumefaciens*) te bolest dlakavog ili

kosmatog korijenja (engl. *hairy root*, *A. rhizogenes*, Chilton i sur. 1977, 1980) na mjestu infekcije. Genetički materijal bakterije *A. rhizogenes* sastoji se od velike kružne dvolančane molekule DNA (bakterijski kromosom) i jednog velikog Ri- (engl. *Root inducing*) plazmida s prijenosnom T-DNA regijom (engl. *transferred-DNA*, Chilton i sur. 1982). U svojem prirodnom ekosustavu, ozljeđene biljke (npr. aktivnošću biljojeda) sintetiziraju jednostavne fenolne spojeve (npr. acetosiringon) koji uzrokuje kemotaksiju bakterija prema mjestu ranjavanja. Bakterije ulaze u međustanične prostore, vežu se za zdrave biljne stanice te u biljni genom prenese i ugrade T-DNA Ri-plazmida. Kemotaksiju i vezanje bakterija za stanicu omogućava ekspresija skupine gena *chv* (engl. *chromosomal virulence*) koji se nalaze na bakterijskom kromosomu (Watson i sur. 1975), dok prijenos i ugradnju T-DNA u biljni genom omogućava ekspresija skupine gena odgovornih za virulenciju (geni *vir*), koji se nalaze na Ri-plazmidu izvan regije T-DNA, a čiju indukciju potiče acetosiringon (Nilsson i Olsson 1997). U sklopu regije T-DNA nalaze se dvije skupine gena: geni za sintezu regulatora rasta i geni za sintezu opina (neobični derivati aminokiselina). Navedeni geni sadrže eukariotske promotore i poliadenilacijske signale, što im omogućava transkripcijsku aktivnost u biljnim stanicama, gdje posreduju u proliferaciji korijenja koji sintetiziraju i secerniraju opine, tvari koje agrobakterije koriste kao hranu (Weising i Kahl 1996). Većina sojeva agrobakterija sadrže samo jednu regiju T-DNA, ali postoje i sojevi koji sadrže tzv. agropinski tip Ri-plazmida (kao npr. pRiHRI, Slika 5), koji u biljnu stanicu prenose dvije nezavisne regije T-DNA - T_L-DNA i T_R-DNA. Regija T_R-DNA homologna je regiji T-DNA Ti- (engl. *Tumor inducing*) plazmida bakterije *A. tumefaciens*, dok je od nje značajno različita regija T_L-DNA, djelomično homologna T-DNA Ri-plazmida manopinskih sojeva bakterija *A. rhizogenes* (Nilsson i Olsson 1997). Indukcija kosmatog korijenja ovisi isključivo o prijenosu T_L-DNA, dok je regija T_R-DNA odgovorna za biosintezu auksina i opina (manopina i agropina, Jouanin 1984). T_L-DNA kodira 18 otvorenih okvira čitanja (engl. *open reading frames*, ORF) ovisno o bakterijskom soju, od kojih su 4 ključna za stvaranje kosmatog korijenja (ORF10, ORF11, ORF12 i ORF15), a odgovaraju genima *rol* (engl. *root locus*, *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD*, Slightom i sur. 1986). Osim gena *rol*, gen *orf13* se također nalazi u sklopu regije T_L-DNA, a uz hormonalne učinke nalik citokininima, ima važnu ulogu i u proliferaciji stanica (Fründt i sur. 1998).

Kultura kosmatog korijenja koristi se u biotehnologiji za sintezu značajnih sekundarnih metabolita (Shanks i Morgan 1999, Sevon i Oksman-Caldentey 2002), za proizvodnju značajnih enzima (npr. superoksid-dismutaze, Hyeon i sur. 2002; peroksidaze,

Kim i Yoo 1996), za proizvodnju monoklonskih protutijela (Sharp i Doran 2001) i drugih proteina. Osim toga, koristi se u fitoremedijaciji (Nedelkoska i Doran 2000) te za dobivanje transgenih biljaka (Choi i sur. 2000, Crane i sur. 2006).

Veliki interes farmaceutske, kozmetičke i prehrambene industrije za značajnim biološkim aktivnostima RA vodio je ka brojnim istraživanjima koja uključuju sintezu RA u kulturi *in vitro* nekoliko biljnih vrsta. Tako je akumulacija RA opisana u kulturi kosmatog korijenja bosiljka (*Ocimum basilicum*, Tada i sur. 1996), miloduha (*Hyssopus officinalis*, Mukarami i sur. 1998), biljke *Coleus forskohlii* (Li i sur. 2005), korejske mente (*Agastache rugosa*, Lee i sur. 2008), mačje metvice (*Nepeta cataria*, Lee i sur. 2010), kineske kadulje (*Salvia miltiorrhiza*, Chen i sur. 2001) i obične kadulje (*Salvia officinalis*, Grzegorzcyk i sur. 2006). Kulturu kosmatog korijenja ukrasne koprive, koja je sintetizirala značajno veće količine RA u odnosu na normalno korijenje, prvi su uspostavili i opisali Bauer i sur. (2009). U usporedbi s akumulacijom RA u kulturama kosmatog korijenja drugih opisanih biljnih vrsta, u pojedinim je linijama kosmatog korijenja ukrasne koprive zabilježena do tada najveća količina RA (Bauer i sur. 2009). Sinteza značajnih sekundarnih metabolita u kulturi kosmatog korijenja dodatno je povećana raznim manipulacijama sastava hranjive podloge (npr. povećanjem sadržaja saharoze u podlozi), promjenom uvjeta uzgoja kulture (svjetlosti, temperature) te tretmanom različitim abiotičkim i biotičkim elicitorima. Također, jedna od strategija za povećanje sinteze sekundarnih metabolita uključuje i genetičku manipulaciju kulture kosmatog korijenja (Berlin i sur. 1993, Hashimoto i sur. 1993, Xiao i sur. 2011). Rubne sekvence T-DNA (25 bp duge lijeva i desna rubna sekvencija, LB i RB) određuju koji će se geni prenijeti iz agrobakterije u biljku i ugraditi u biljni genom. Ovaj prirodni fenomen iskorišten je u genetičkom inženjerstvu za transformaciju biljaka željenim genom koji se smješta unutar T-DNA nakon izrezivanja postojećih gena. Tako su Bauer i sur. (2011), u svrhu povećanja sinteze RA u kulturi transgenog korijenja, transformirali tkivo ukrasne koprive genom *PAL1* iz uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*). Pojačana ekspresija gena *PAL1* vodila je ka povećanoj aktivnosti enzima PAL, ali i ka sniženju razine ukupnih fenola i RA. Iako je prema literaturnim navodima povećana aktivnost enzima PAL u pozitivnoj korelaciji s povećanom sintezom RA, u istraživanju koje su proveli Bauer i sur. (2011) to nije bio slučaj. Povećanje sinteze RA genetičkom manipulacijom zabilježeno je u kulturi kosmatog korijenja kineske kadulje (*S. miltiorrhiza*) uslijed pojačane ko-ekspresije gena *tat* i *hppr* (Xiao i sur. 2011).



Slika 5. Shematski prikaz agropinskog tipa Ri-plazmida, pRiHRI, iz bakterije *A. rhizogenes*. Na plazmidu se nalazi skupina gena odgovornih za virulenciju (geni *vir*), T_R-DNA koja nosi gene za biosintezu auksina i opina te T_L-DNA o kojoj ovisi indukcija kosmatog korijenja. T_L-DNA kodira 18 ORF-a (1-18), koji su označeni žutim kvadratićima. Žuti kvadratići iznad linije predstavljaju transkripte koji se prepisuju s lijeva na desno, dok žuti kvadratići ispod linije predstavljaju transkripte koji se prepisuju s desna na lijevo. LB: lijeva granična sekvenca; RB: desna granična sekvenca. Modificirano prema: Jouanin 1984, Slightom i sur. 1986.

1.4. Biotički elicitori

Elicitori su tvari biološkog ili nebiološkog porijekla koji, u doticaju sa stanicama viših biljaka, izazivaju fiziološke i morfološke promjene koje uključuju povećanu sintezu i/ili *de novo* sintezu sekundarnih metabolita (Benhamou 1996). Biotički elicitori su biološkog porijekla kao npr. plijesni, bakterije, virusi, ali i komponente stanične stijenke biljaka te fitokemikalije koje se otpuštaju na mjestu napada biljke patogenima i biljojedima. Obrambene reakcije koje predstavljaju odgovor na štetne okolišne čimbenike omogućavaju biljkama njihov opstanak. Budući da biotički elicitori induciraju obrambeni odgovor biljke, često se koriste u *in vitro* proizvodnji važnih sekundarnih metabolita (Zhao i sur. 2005). Osim toga, tretmani biotičkim elicitorima se često koriste i za povećanje otpornosti biljaka na patogene ali i na druge okolišne stresne čimbenike. Dobar primjer elicitacije sinteze sekundarnih metabolita, pomoću različitih biotičkih elicitora, je biosinteza taksola pomoću stanične kulture. Biosinteza taksola opsežno je istraživana budući da je sintetska proizvodnja ovog biljnog sekundarnog metabolita vrlo skupa (Radman i sur. 2003). Tretman metil-jasmonatom uzrokuje povećanje sinteze RA u staničnoj suspenziji ukrasne koprive (Szabo i sur. 1999), kao i akumulaciju RA u kulturi kosmatog korijenja biljke *C. forskohlii* (Li i sur. 2005). Osim toga, i tretmani fungalnima elicitorima značajno povećavaju sintezu RA u kulturi *in vitro*, kao što je to slučaj kod tretmana kosmatog korijenja kineske kadulje (*S. miltiorrhiza*, Yan i sur. 2006), u kosmatog korijenja bosiljka (*O. basilicum*, Bais i sur. 2002) te u kulturi kosmatog korijenja biljke *C. forskohlii* (Li i sur. 2005).

Primjenom elicitora u biljkama se aktiviraju signalni putevi unutarstanične obrane, stoga su brojna istraživanja pokazala kako biljke tretirane elicitinima razvijaju otpornost (Odjacova i Hadjiivanova 2001, Garcia-Brugger i sur. 2006). Elicitori induciraju proizvodnju ROS-a i potiču obrambeni mehanizam biljke, a također izazivaju hipersenzitivni odgovor (Ebel i Cosio 1994, Nürnberger 1999). Proučavanje elicitora također je neophodno kako bi se stvorile učinkovite strategije za smanjenje negativnog učinka oksidacijskog stresa u biljkama (Ceron-Garcia 2012).

Oomicetalni fitotoksini, tzv. elicitini, skupina su proteinskih elicitora. Elicitini su vrlo konzervirani holoproteini (10 kDa) koje izlučuju sve vrste roda *Phytophthora* te nekoliko vrsta roda *Phytium* (Kamoun i sur. 1993, Heut i sur. 1995). Vrste roda *Phytophthora* izlučuju jedan ili nekoliko izooblika takvih molekula. Elicitini imaju ulogu kao toksični i signalni proteini koji induciraju obrambeni odgovor biljke, uključujući HR i

nekrozu lista. Elicitini ne prolaze nikakve post-translacijske modifikacije osim uklanjanja signalnog peptida prije sekrecije u staničnu podlogu. Poznate su dvije strukturne skupine elicitora (α - i β -elicitori), koje se razlikuju prema svojim biološkim učincima. Alfa-elicitori su kiseli proteini s valinskim aminokiselinskim ostatkom na 13. mjestu, dok su β -elicitori bazični proteini s hidrofilnim aminokiselinskim ostatkom (lizinskim ili treoninskim) na istom položaju. Aminokiselinski ostatak na 13. mjestu može biti aktivno ili regulatorno mjesto ključno za toksičnost, odnosno odgovorno za nekrozu. Beta-elicitori uzrokuju jaču nekrozu listova te pružaju bolju zaštitu tijekom naknadnog napada patogena u odnosu na α -elicitorine (Yu i sur. 1995).

Elicitini iz različitih vrsta pokazuju različite razine toksičnosti koje su posljedica strukturnih obilježja. Smatra se da je biološka uloga elicitora prijenos sterola iz biljke domaćina, budući da neke fitopatogene oomicete roda *Phytophthora* ne mogu same sintetizirati sterole potrebne za njihov rast i oplodnju. Osim toga, stvaranje kompleksa elicitor:sterol potrebno je za aktivaciju bioloških odgovora stanica i biljaka duhana, budući da se samo elicitori povezani sa sterolom mogu vezati za receptor na plazma membrani (Ponchet i sur. 1999).

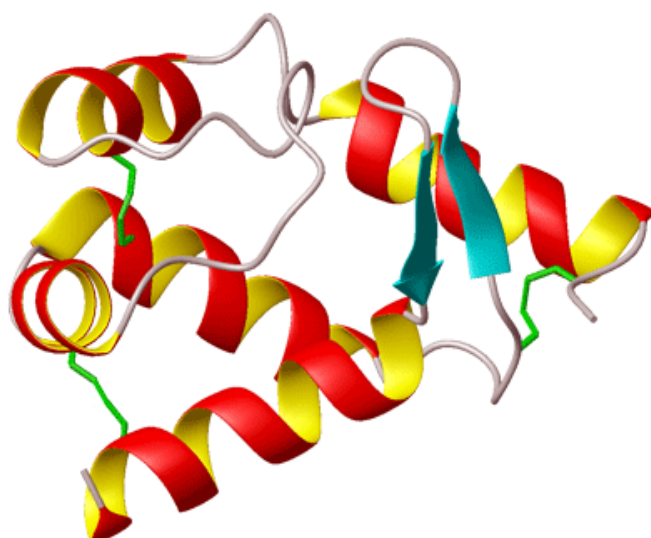
1.4.1. Beta-kriptogein

Beta-kriptogein je proteinski elicitor (elicitor), veličine 10 kDa, kojeg secernira fitopatogena oomiceta *P. cryptogea* (Boissy i sur. 1996, Ricci i sur. 1989). Provedena istraživanja pokazala su da je riječ o proteinu koji prenosi sterolne komponente (Mikes i sur. 1997). Trodimenzionalna struktura β -kriptogeina određena je pomoću kristalografije i nuklearne magnetske rezonancije (Boissy i sur. 1996). Beta-kriptogein na jednoj strani ima 5 slabije konzerviranih α -petlji, dok je na drugoj strani visoko konzervirana kljunasta struktura koju oblikuju 2 antiparalelne β -ploče i Ω -petlje (Slika 6). Receptore za β -kriptogein čine glikozilirani heterodimerni proteini smješteni na plazma membrani (Bourque i sur. 1999).

Beta-kriptogein u duhana (*Nicotiana tabacum*) može izazvati hipersenzitivni odgovor i sustavno stjecanje otpornosti prema fitoftori *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* i drugim patogenima (Ricci i sur. 1989, Binet i sur. 2001). Tretman β -kriptogeinom stimulirao je rast kosmatog korijenja zimske trešnje (*Withania somnifera*) i ladoleža (*Convolvulus sepium*) kao i povećanu sintezu nor-tropanskih alkaloida

(kalistegina) u korijenju ladoleža (Chaudhuri i sur. 2009). S ciljem boljeg razumjevanja biokemijskih procesa koje izazivaju elicitini, mnogi su znanstvenici proučavali učinke β -kriptogeina na suspenziji stanica duhana (*N. tabacum* cv. Xanthi). Mehanizam djelovanja ovog elicitora uključuje mnoge biokemijske događaje kao što su promjene u strujanju iona, fosforilaciju proteina, aktivaciju NADPH-oksidadze i protein-kinaze, kao i stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki (Viard i sur. 1994, Tavernier i sur. 1995, Pugin i sur. 1997, Lebrun-Garcia i sur. 1998, Kieffer i sur. 2000, Leborgne-Castel i sur. 2008). U stanicama duhana BY-2, β -kriptogein povećava transkripciju većine gena koji su uključeni u fenilpropanoidni biosintetski put te u ovisnosti o kalciju inducira akumulaciju fenolnih spojeva koji se povezuju sa staničnom stijenkom (Amelot i sur. 2011).

O'Donohue i sur. (1996) su sintetizirali gen koji kodira β -kriptogein, čija je ekspresija u ekspresijskim sustavima *Escherichia coli* i *Pichia pastoris* vodila ka sintezi biološki aktivnog β -kriptogeina. Infiltriran u list duhana dobiveni rekombinantni protein pokazuje nekrotičnu aktivnost povezanu s obrambenim odgovorom (O'Donohue i sur. 1995, O'Donohue i sur. 1996). Nekoliko istraživanja opisuje transformaciju genom *crypt* s ciljem postizanja rezistencije na napad patogena. Tako je transformacija duhana ovim genom rezultirala rezistencijom duhana prema *P. parasitica* var. *nicotianae* (Tepfer i sur. 1998, Keller i sur. 1999, Donghua i sur. 2004). Chaudhuri i sur. (2009) u svojim su istraživanjima pokazali da transformacija sintetičkim genom *crypt* pod kontrolom CaMV 35S promotora uzrokuje povećanje rasta i sinteze sekundarnih metabolita u kulturi transgenog korijenja zimske trešnje (*W. somnifera*, povećanje vitanolida) i ladoleža (*C. sepium*, povećanje kalistegina) te u transgenom poljskom slaku (*Convolvulus arvensis*, povećanje kalistegina). Transformacija genom *crypt* stimulirala je i akumulaciju flavonoida u sjemenu transgenog uročnjaka (Chaudhuri i sur. 2009). Nadalje, transgene biljke bakope (*Bacopa monnieri*), koje eksprimiraju gen *crypt* pokazuju značajno povećanje sadržaja bakopa saponina u odnosu na biljke divljeg tipa. Dobivene transgene linije biljka mogu poslužiti za proizvodnju bakopa saponina (Majumdar i sur. 2012).



Slika 6. Struktura β -kriptogeyna. Preuzeto s Weba 1.

1.5. Inducibilni promotor reguliran alkoholom

Inducibilni promotori su genski promotori koji se koriste za rekombinantnu ekspresiju, a aktivnost im je regulirana prisutnošću ili odsutnošću abiotičkih ili biotičkih čimbenika. Upotreba inducibilnih promotora predstavlja vrlo vrijednu strategiju u proučavanju učinaka promjenjene genske ekspresije unutar biljne stanice. Putem ovih promotora moguća je kontrola vremena i razine genske ekspresije. Nadalje, upotrebom inducibilnih promotora moguće je izbjeći štetne učinke do kojih može doći uslijed konstitutivne ekspresije nekih gena (Hammond-Kosack i sur. 1994).

Inducibilni alkoholni ekspresijski sustav se temelji na *alc* regulonu iz plijesni *Aspergillus nidulans* (Felenbok 1991), a čine ga dvije komponente: AlcR transkripcijski čimbenik kojeg kodira *alcR* gen pod kontrolom konstitutivnog CaMV 35S promora i promotor *alcA* gena. Nakon tretmana, induktor stupa u interakciju s transkripcijskim faktorom AlcR, koji se zatim veže na promotor *alcA* te potiče ekspresiju gena nizvodno od promotora. U odsutnosti induktora protein AlcR ne može vezati specifičnu sekvencu promotora *alcA* koji je povezan s genom od interesa te ne dolazi do njegove ekspresije. Upotreba *alcA* ekspresijskog sustava prethodno je opisana u duhanu (*N. tabacum*, Caddick i sur. 1998, Slater i sur. 1998, Sweetman i sur. 2002), uročnjaku (*A. thaliana*, Roslan i sur.

2001), krumpiru (*Solanum tuberosum*, Sweetman i sur. 2002), uljanoj repici (*Brassica napus*, Sweetman i sur. 2002), topoli (*Populus* sp, Filichkin i sur. 2006), rajčici (*Lycopersicon esculentum*, Garoosi i sur. 2005) i kosmatom korijenju madagaskarskog zimzelena (*Catharanthus roseus*, Peebles i sur. 2007). U biljaka, alcA ekspresijski sustav odgovara na tretman različitim kemijskim induktorima kao što su acetaldehid, 2-butanon, propanol, aceton, etanol i dr. Od svih testiranih induktora, najveća razina ekspresije transgena postignuta je tretmanom etanolom (Garoosi i sur. 2005, Filichkin i sur. 2006).

1.6. Reaktivne kisikove jedinice i oksidacijski stres

Oksidacijski stres podrazumijeva stanje u kojem su oksidacijsko-redukcijski procesi u stanicama pomaknuti prema oksidaciji, odnosno to je stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do gubitka ravnoteže stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti neke stanice da ih razgradi, a rezultira promjenama vezanim za oštećenje stanica (Sies 1985, Poli i Parola 1997). Promjenu ravnoteže uzrokuju različiti procesi koji potiču stvaranje ROS-a. ROS je zajednički naziv koji uključuje slobodne radikale kisika kao što su superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), perhidroksil radikal ($HO_2^{\cdot-}$), alkoksil ($RO\cdot$) i peroksil ($RO_2\cdot$) radikal te neradikalne spojeve ili molekule kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), singletni kisik (1O_2) i ozon (O_3) (Halliwell 1996). Radi se o vrlo reaktivnim molekulama koje mogu stupiti u interakciju s nizom različitih molekula u stanici kao što su DNA, ugljikohidrati, lipidi, proteini i dr. te tako oštetiti različite stanične komponente. U normalnim uvjetima, ROS se pojavljuju u stanicama kao štetni nusprodukti, nastali kao rezultat uzastopne redukcije molekularnog kisika.

Dosadašnja istraživanja koja su se temeljila na mehanizmima stvaranja ROS-a i njegovim funkcijama u biljkama, pokazala su kako je stvaranje i akumulacija ROS-a specifičan odgovor biljke na napad patogenih mikroorganizama (Bowell 2001). Osim što imaju ulogu u direktnoj obrani od napada patogena, istraživanja su pokazala da ROS služe i kao signalne molekule u aktiviranju daljnje biljne zaštite koja, između ostalog, obuhvaća i akumulaciju fitoaleksina te aktivaciju gena uključenih u obranu biljke (Van Breusegem i sur. 2008). Nekoliko enzima uključeno je u proizvodnju ROS-a nakon uspješnog prepoznavanja patogena (Torres i sur. 2006). Jedan od prvih događaja nakon prepoznavanja patogena uključuje aktivaciju NADPH-oksidade u plazma membrani

(Keller i sur. 1998). Stvaranje ROS-a u staničnim kulturama tretiranim elicitorima ponajviše ovisi o aktivnosti enzima apoplastnih peroksidaza i NADPH-oksidaža (Bolwell i Wojtaszek 1997). Upotreba specifičnih inhibitora pokazala je kako su NADPH-oksidaža membrane i peroksidaze stanične stijenke dva najvjerojatnija biokemijska izvora ROS-a nakon infekcije patogenom (Grant i sur. 2000). U mnogim biljnim sustavima, stvaranje ROS-a odvija se u dvije faze; do prve faze stvaranja ROS-a dolazi 10-30 minuta, dok do druge faze stvaranja ROS-a dolazi 1-3 sata nakon tretmana fungalnim/oomicetalnim elicitorom (Bolwell i Wojtaszek 1997, Zhao i sur. 2001). Preduvjet za stvaranje ROS-a predstavlja povećanje razine slobodnih iona Ca^{2+} unutar citosola (Zhao i sur. 2001, White i Broadley 2003). U krumpiru su identificirana dva različita gena za NADPH-oksidažu koja su odgovorna za stvaranje ROS-a u dvije faze, od kojih je jedan reguliran fosforilacijom proteina neovisnom o Ca^{2+} (Yoshioka i sur. 2001). Vrlo je vjerojatno da do stvaranja ROS-a induciranog elicitorom, dolazi ili uslijed aktiviranja NADPH-oksidaže direktnim vezanjem elicitora ili putem protein-kinaza ovisnih o sustavu Ca^{2+} /kalmodulin (Zhao i sur. 2005).

1.6.1. Pokazatelji oksidacijskog stresa

1.6.1.1. Vodikov peroksid

Vodikov peroksid (H_2O_2) je vrlo značajan reaktivni oblik kisika koji se aktivno stvara u stanici, a preteča je brojnim drugim radikalima. Budući da je relativno stabilan i ima dug životni vijek, može dospjeti i do staničnih lokacija vrlo udaljenih od samog mjesta nastajanja te proći kroz membranu biljne stanice (Wojtaszek 1997).

U biljnim stanicama uglavnom nastaje tijekom procesa fotosinteze, fotorespiracije te, u manjoj mjeri, staničnog disanja (Bhattacharjee 2005, Ślesak i sur. 2007). Do pojačanog stvaranja H_2O_2 dolazi kada je biljka izložena različitim stresnim uvjetima (Foyer i sur. 1997). Smatra se da H_2O_2 također ima ulogu signalne molekule koja posreduje u otpornosti biljaka na biotički i abiotički stres, ali također i u procesima rasta i razvoja biljke (Bhattacharjee 2005, Ślesak i sur. 2007).

Patogenom inducirana proizvodnja H_2O_2 ima nekoliko učinaka. Peng i Kuc (1992) ističu kako H_2O_2 ima direktno toksično djelovanje na mikroorganizme. Osim toga,

posebno je važna signalna uloga H_2O_2 koja dovodi do SAR (Noctor i Foyer 1998) te upravljanja hipersenzitivnim odgovorom tijekom smrti stanice (Tenhaken i sur. 1995).

Odsutnost gena za NADPH-oksidazu (NOX) u uročnjaka smanjuje proizvodnju H_2O_2 , a time smanjuje i obrambene reakcije protiv patogena (Torres i sur. 2002). NOX prenosi elektrone sa citoplazmatskog NADPH na molekularni kisik pri čemu nastaje $O_2^{\cdot-}$ (Simon-Plas i sur. 2002). Nastali superoksidni ioni podliježu reakciji dismutacije koju katalizira superoksid dismutaza (SOD), pri čemu nastaje H_2O_2 koji se nakuplja na mjestu napada (Thordal-Christensen 1997). Unutarstanična razina H_2O_2 regulirana je širokim rasponom enzima od kojih su najvažniji katalaza i različite peroksidaze koje nastali H_2O_2 uklanjaju prevođenjem u vodu.

1.6.1.2. Lipidna peroksidacija

Kao pokazatelj oksidacijskog stresa najčešće se mjere krajnji produkti lipidne peroksidacije (npr. malondialdehid), budući da im je vrijeme poluživota duže nego u slobodnih radikala, što je pogodno za mjerenje. Povećanje koncentracije ROS najprije se odražava na pojačanoj peroksidaciji lipida, koji se pri normalnim uvjetima u organizmu peroksidiraju malo ili se uopće ne peroksidiraju. Lipidna peroksidacija (LPO) počinje napadom radikala na alilni vodik nezasićene masne kiseline čime započinje lančana reakcija peroksidacije. Ove reakcije narušavaju temeljnu strukturu, biofizičke značajke i konformaciju masnih kiselina, čime se narušava i cjelovitost biološke membrane (Feher i sur. 1987, Braughler i Hall 1989).

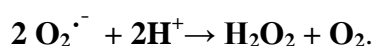
Lipidna peroksidacija predstavlja vrlo važnu značajku stanične smrti te tipičnu obrambenu reakciju do koje dolazi tijekom interakcije biljka-patogen. Istraživanja utjecaja oomicetalnih elicitora na lipidnu peroksidaciju pokazuju kako se nakon tretmana krumpira elicitorom oomicete *P. infestans* povećava aktivnost lipooksigenaze (LOX), ključnog enzima lipidne peroksidacije koji ima ulogu u formiranju hidroperoksida koji se vrlo brzo prevode u seriju reaktivnih spojeva (Göbel i sur. 2003). Također je pokazano kako je lipidna peroksidacija u listu duhana povezana sa HR induciranim β -kriptogeinom (Rusterucci i sur. 1999).

1.7. Antioksidacijski sustav biljne obrane

Tijekom evolucije aerobnih organizama razvili su se različiti mehanizmi zaštite od štetnog utjecaja ROS (Halliwell 1999). Kako bi uspješno spriječile i/ili smanjile oštećenja nastala uslijed oksidativnog stresa, biljke su razvile kompleksan antioksidativni mehanizam regulacije ROS-a. Uklanjanje ROS-a u biljnim stanicama odvija se pomoću različitih komponenata enzimskog ili neenzimskog antioksidacijskog obrambenog sustava (Alscher i sur. 2002). Neenzimski sustav čine antioksidansi kao npr. flavoni, tokoferoli, antocijanini, karotenoidi i askorbinska kiselina, dok enzimski antioksidacijski sustav biljaka čine antioksidacijski enzimi. Najvažniji enzimi su superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat-peroksidaze (APX), gvajakol-peroksidaze (GPOD) i druge nespecifične peroksidaze (Ashraf 2009). Ovi enzimi dolaze u različitim izoenzimskim oblicima prisutnim u različitim staničnim odjeljcima. Njihova je ekspresija genetički kontrolirana te je prema potrebi regulirana razvojnim i okolišnim podražajima kako bi se uklonio proizvedeni ROS u stanicama (Di Cagno 2001, De Gara 2003).

1.7.1. Superoksid-dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) pripada skupini metaloenzima, a katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\cdot-}$) u vodikov peroksid (H_2O_2), pri čemu se jedna molekula $O_2^{\cdot-}$ oksidira u O_2 , a druga reducira u H_2O_2 , prema reakciji:



SOD se unutar stanice nalazi u gotovo svim substaničnim odjeljcima u kojima dolazi do stvaranja ROS-a te ima ključnu ulogu u obrani stanice od oksidativnih oštećenja (Elstner 1991, Scandalios 1993). Na temelju metalnih iona koji su kofaktori enzima, u biljkama razlikujemo tri skupine izoenzima SOD: željezo-ovisne SOD (FeSOD), mangan-ovisne SOD (MnSOD) i bakar-cink-ovisne SOD (CuZnSOD). Navedene skupine izoenzima SOD su unutar stanice smještene u različitim odjeljcima. Tako se FeSOD nalazi unutar kloroplasta, MnSOD unutar mitohondrija i peroksisoma, dok se izoenzimi CuZnSOD nalaze u kloroplastima, citosolu i izvanstaničnom prostoru (Alscher i sur. 2002).

Brojna istraživanja pokazuju kako se povećane aktivnosti SOD javljaju u biljaka koje su izložene različitim okolišnim stresnim čimbenicima kao npr. suši (Sharma i Dubey 2005) i povećanoj koncentraciji teških metala (Mishra i sur. 2011). Osim toga, povećane aktivnosti SOD javljaju se i uslijed stvaranja velikih količina ROS do kojih dolazi tijekom interakcije između biljke i patogena. Tako je npr. povećana ekspresija gena za CuZnSOD i povećana aktivnost ovog enzima zabilježena tijekom sustavne otpornosti (inducirane acibenzolar-*S*-metilom) prema antraknozi, oboljenju koje uzrokuje patogen *Colletotrichum orbiculare* (Deepak i sur. 2006). U stanicama ruže tretiranim elicitorom fitoflore također dolazi do povećanja aktivnosti SOD (Auh i Murphy 1995), kao i u kulturi transgenog korijenja korejskog ženšena (*Panax ginseng*) i američkog ginsenga (*Panax quinquefolium*) tretiranog metil-jasmonatom (Ali i sur. 2005). Povećane aktivnosti SOD često su u korelaciji s povećanom tolerancijom biljaka na okolišne stresne čimbenike (Gupta i sur. 1993).

1.7.2. Katalaza

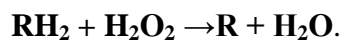
Katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu i kisik prema reakciji:



Biljne katalaze su tetramerni hemoproteini koji se nalaze uglavnom u peroksisomima i glioksisomima. CAT je enzim visokog kapaciteta ali niskog afiniteta za razgradnju H_2O_2 te ima veću brzinu ali mnogo niži afinitet za H_2O_2 od peroksidaze (Willkenes i sur. 1995.). Smatra se kako je CAT kompetitor enzimu GPOD budući da koriste isti supstrat. CAT je aktivna samo pri relativno visokim koncentracijama H_2O_2 , dok se niže koncentracije H_2O_2 uklanjaju pomoću GPOD (Gadjev i sur. 2008). Ova činjenica govori da je CAT odgovorna za uklanjanje većine H_2O_2 u uvjetima oksidacijskog stresa. Iako katalaze imaju važnu ulogu u uklanjanju većine H_2O_2 , zbog visokog afiniteta za H_2O_2 i prisutnosti na različitim lokacijama unutar stanice, peroksidaze uklanjaju onaj H_2O_2 koji je CAT nedostupan (Van Breusegem i sur. 2001).

1.7.3. Gvajakol-peroksidaze

Peroksidaze su enzimi koji kataliziraju redoks reakcije između vodikovog peroksida i različitih reducensa (Hiraga i sur. 2001):



Gvajakol-peroksidaze (GPOD, EC 1.11.1.7) pripadaju biljnim peroksidazama razreda III, koje imaju velik broj izooblika i različito reguliranu ekspresiju, a uključene su u brojne stanične procese tijekom razvoja biljaka, u odgovore biljaka na stresne čimbenike iz okoliša te sudjeluju u obrani biljaka od patogena zbog svojih baktericidnih i fungicidnih svojstava (Gaspar i sur. 1991, Passardi i sur. 2005). Hiraga i sur. (2001) ističu kako je nekoliko GPOD izoenzima u biljkama inducirano tijekom ranjavanja i infekcije patogenom, što naglašava njihovu važnost u obrani biljke. Aktivnost GPOD u korelaciji je s biljnom obranom protiv patogena (Jwa i sur. 2006). Osim što sudjeluju u obrambenim odgovorima tijekom napada patogena, peroksidaze imaju važnu fiziološku ulogu u sintezi polimera stanične stijenke koji predstavljaju fizičku barijeru protiv biotičkog i abiotičkog stresa (Quiroga i sur. 2000). Budući da GPOD imaju veći afinitet za H₂O₂ od CAT, njihova je uloga u uklanjanju ROS-a tijekom oksidativnog stresa važnija od uloge koju ima CAT (Gill i Tuteja 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Osnovna hipoteza rada je da inducibilna ekspresija β -kriptogeina u transgenom korijenju utječe na sintezu fenolnih spojeva, te u skladu s tim i na sadržaj ukupnih topljivih fenola, ružmarinske i kavene kiseline u tkivu te na njihovu sekreciju u tekuću hranjivu podlogu. Osim toga, pretpostavka je da se utjecaj endogeno sintetiziranog β -kriptogeina odražava i na rast transgenog korijenja. Kako je jedan od ranih odgovora biljke na biotičke elicitore stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki očekuje se da će elicitacija β -kriptogeinom utjecati i na oksidacijsko/antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive.

Kako bi se istražila utemeljenost hipoteza postavljeni su slijedeći istraživački ciljevi:

- Transformirati stanice ukrasne koprive binarnim vektorom koji sadrži gen *crypt* (pBinSRNA-CRYPT) te iz njih regenerirati transgeno korijenje;
- Odrediti učinak inducibilne ekspresije β -kriptogeina na rast transgenog korijenja ukrasne koprive te na sadržaj fenolnih spojeva, ružmarinske i kavene kiseline u tkivu i tekućoj hranjivoj podlozi;
- Odrediti učinak genetičke elicitacije β -kriptogeinom na oksidacijski/antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Pri izradi ovoga rada upotrijebljene su sljedeće kemikalije:

- Aceton (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Akrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Coomassie briljant plavo G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Agaroz (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- 2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Amonijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Amonijev peroksodisulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Anorganske soli za pripremu MS hranjive podloge (Tablica 1. Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Baktotripton (Difco, BD, Franklin Lakes, SAD)
- Bisakrilamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Borna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bromfenol plavilo (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Dietil-pirokarbonat (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ekstakt kvasca (Difco, BD, Franklin Lakes, SAD)
- Etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Etilidijev bromid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Etilendiamintetraoctena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Formaldehid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Fosfatna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Glicerol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Glicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Goveđi ekstrakt (Difco, BD, Franklin Lakes, SAD)
- Gvajakol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Mio-inozitol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kalijev cijanid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalijev dihidrogen fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

- Kalijev hidrogen fosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kanamicin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Karbencilin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Kavena kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Klorovodična kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- β -Merkaptoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska; Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Metionin (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev dodecil sulfat (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Natrijev karbonat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev hidroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev tiosulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Nikotinska kiselina (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Nitro-plavi tetrazolijski klorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Octena kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Pepton (Difco, BD, Franklin Lakes, SAD)
- Piridoksin-HCl (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Polivinil-polipirolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Riboflavin (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Ružmarinska kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Saharoza (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Srebrov nitrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Sulfatna kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Tetrametiletilendiamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Tiamin-HCl (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Tiobarbituratna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Titanov reagens (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Trikloroctena kiselina (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Vodikov peroksid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Komercijalni kompleti i proteini

Pri izradi ovoga rada upotrijebljeni su sljedeći komercijalni kompleti i proteini:

- PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, Madison, SAD)
- DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Dynabeads® mRNA Direct™ Micro kit (Dyna, Oslo, Norveška)
- Set deoksiribonukleotida (dATP, dTTP, dCTP, dGTP; Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- GoTaq DNA polimeraza (Promega, Madison, SAD)
- Reverzna transkriptaza RevertAid™ H Minus M-MuLV (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)
- Inhibitor RNaze RiboLock™ (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)
- Rekombinantni inhibitor RNaze RnaseOUT™ (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, SAD)
- Albumin goveđeg seruma (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Rekombinantni β -kriptogein (dar dr. sc. Michaela O'Donohuea)

3.1.3. Standardi duljine odsječaka DNA i molekularne mase

Kao standard duljine odsječaka DNA korišteni su:

- Direct Load Step Ladder, 50 bp (Sigma-Aldrich, St. Luis, SAD)
- Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)
- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka)

Kao standard molekularne mase proteina pri SDS-PAGE analizi korišten je:

- BIO-RAD Precision Plus Protein™ Standard (BIO-RAD, Hercules, CA, SAD)

3.1.4. Oligonukleotidne početnice

Početnice upotrijebljene u ovom radu sintetizirala je tvrtka Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, SAD) i Sigma-Aldrich (St. Luis, SAD). U Tablici 1. navedene su sve korištene početnice sa oligonukleotidnim slijedom i očekivanom veličinom PCR produkta.

Tablica 1. Sljedovi oligonukleotidnih početnica korišteni za umnažanje odsječaka gena (ili genskog transkripta) *crypt*, *orf13*, *virB10* i β -*actin* lančanom reakcijom polimeraze.

| Početnice | Oligonukleotidni slijed | Veličina PCR produkta |
|--|------------------------------------|-----------------------|
| <i>crypt</i> FW | 5'-TCCGGTTCGACATGGCTTGC ACTGCTAC | 329 bp |
| <i>crypt</i> REV | 5'-CCATGTTCGACCTACAAGGAAGAGCACTTGT | |
| <i>orf13</i> FW | 5'-CAGCTTCTAAATGTGGTGGAGGCC | 498 bp |
| <i>orf13</i> REV | 5'-CCTTGCCGATTGCCAGTATGGC | |
| <i>virB10</i> FW | 5'CAATCCCGATCAAGTCGTGCGC | 644 bp |
| <i>virB10</i> REV | 5'AGACGCCAACCTCGTGAAACCG | |
| β - <i>actin</i> FW1 | 5'GTCGCTCCTGAAGAGCACCCCTG | 418 bp (gen. DNA) |
| β - <i>actin</i> REV1 | 5'CTCGGCAGTTGTGGTAAACATGTAG | 330 bp (cDNA) |
| β - <i>actin</i> FW2 | 5'GCTAGTGGCCGTACAACAG | 218 bp (gen. DNA) |
| β - <i>actin</i> REV2 | 5'CAGTGAGATCACGACCAGC | 130 bp cDNA |
| Oligo d(T) ₁₈ početnice (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka) | | |

3.1.5. Hranjive podloge

3.1.5.1. Hranjiva podloga po Murashige i Skoog-u

U Tablici 2. naveden je sastav Murashige i Skoog (MS) hranjive podloge (Murashige i Skoog 1962). Nakon pripreme podloge pomoću 0.5 M NaOH podešen je pH na 5.7. Hranjiva podloga sterilizirana je u autoklavu 10 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku 0.15 MPa. Kruta je hranjiva podloga pripremljena dodatkom 0.8% (w/v) agara u tekuću hranjivu podlogu. Nakon sterilizacije kruta je podloga razlivena u Petrijeve zdjelice.

Tablica 2. Sastav MS hranjive podloge.

| Sastav | Koncentracija ($\text{mg} \times \text{L}^{-1}$) |
|---|--|
| Makroelementi | |
| NH_4NO_3 | 1650 |
| KNO_3 | 1900 |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 755 |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 370 |
| KH_2PO_4 | 170 |
| Mikroelementi | |
| H_3BO_3 | 6.2 |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 16.9 |
| $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 8.6 |
| KI | 0.83 |
| $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.25 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.025 |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.8 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.3 |
| Organski dodaci | |
| m-Inozitol | 100 |
| Nikotinska kiselina | 1 |
| Tiamin-HCl | 10 |
| Piridoksin-HCl | 1 |
| Glicin | 2 |
| Saharoza | 20000 |

3.1.5.2. Bakterijske hranjive podloge

Bakterije su uzgajane na krutim i tekućim LB (Lauria Bertani) i YEP (engl. *Yeast Extract Peptone*) hranjivim podlogama. Nakon pripreme, podlogama je pomoću 0.5 M NaOH podešen pH te su podloge sterilizirane u autoklavu 10 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku 0.15 MPa. Kruta je hranjiva podloga pripremljena dodatkom 1.5% (w/v) agara u tekuću hranjivu podlogu. Nakon sterilizacije podloga je razlivena u Petrijeve zdjelice.

LB tekuća hranjiva podloga, pH 7.0:

| | |
|-----------------|------------------------|
| Baktotripton | 10 g × L ⁻¹ |
| Ekstrakt kvasca | 5 g × L ⁻¹ |
| NaCl | 10 g × L ⁻¹ |

YEP tekuća hranjiva podloga, pH 7.0:

| | |
|-----------------|-----------------------|
| Goveđi ekstrakt | 5 g × L ⁻¹ |
| Ekstrakt kvasca | 1 g × L ⁻¹ |
| Pepton | 1 g × L ⁻¹ |
| Saharoza | 5 g × L ⁻¹ |

3.1.6. Biljni materijal

Početni biljni materijal za izradu ovog rada bio je šareni kultivar ukrasne koprive (*C. blumei* Benth.) kojeg karakteriziraju tamno crveni listovi s tankim zelenim obrubom (Slika 7A). Eksperimentalne biljke su rasle u kulturi *in vitro*, u Erlenmayerovim tikvicama (300 mL) u 50 mL krute hranjive podloge MS s 3% (w/v) saharoze. Biljke su uzgajane u klima komori na +25 °C, pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih lampi (49 W, 400-700 nm, 2000 lux) sa 16 satnim fotoperiodom. Svakih su 10 tjedana biljke umnažane metodom nodalnih odsječaka. Za potrebe pokusa genetičke transformacije korištene su tromjesečne biljke (Slika 7B).

U istraživanju je korištena i kultura kosmatog korijenja ukrasne koprive (linija OA4), dobivena transformacijom pomoću bakterije *A. rhizogenes*, soja A4 (pRiHRI), koju su uspostavili i opisali Bauer i suradnici (2009). Linija OA4 ne nosi gen *crypt* te je poslužila kao kontrolna linija.



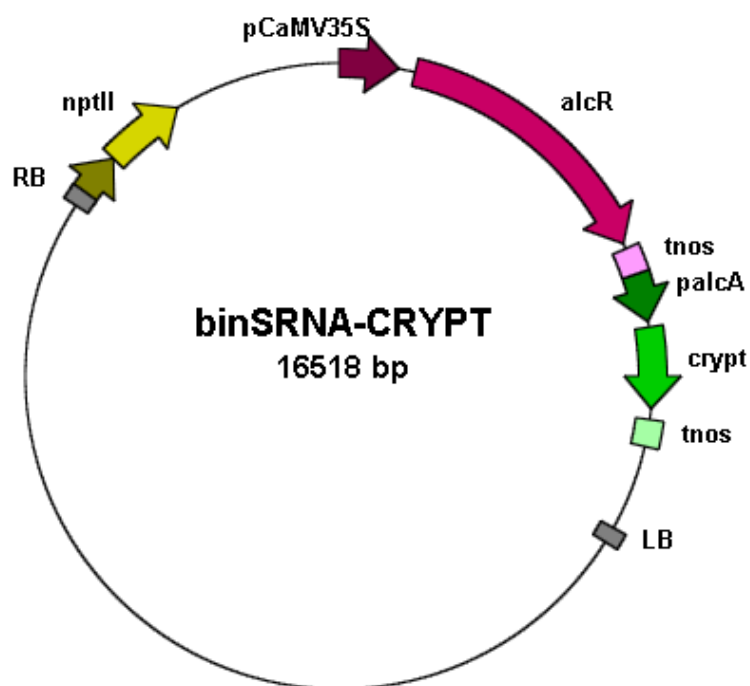
Slika 7. A) Šareni kultivar ukrasne koprive (*C. blumei* Benth.). B) Tromjesečna biljka šarenog kultivara ukrasne koprive uzgojena *in vitro* na hranjivoj MS podlozi s 3% (w/v) saharoze i 0.8% (w/v) agara, umnožena metodom nodalnih odsječaka. Foto: N. Bauer i R. Vuković.

3.1.7. Bakterije

Genetička transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive izvedena je pomoću bakterija *A. rhizogenes*, soja A4, koji sadrži binarni vektor pBinSRNA-CRYPT (Slika 8). Za potrebe transformacije, bakterijske su kulture uzgajane na tresilici pri +28 °C, u YEP hranjivoj podlozi s dodatkom kanamicina ($30 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) za selekciju bakterija s transformacijskim vektorom. Dva dana stara suspenzija agrobakterija upotrijebljena je za inokulaciju lisnih eksplantata.

Kod binarnih vektorskih sustava regija T-DNA i geni *vir* smješteni su na različitim plazmidima unutar iste agrobakterijske stanice. T-DNA se nalazi na binarnom vektoru, dok se geni *vir* (odgovorni za virulenciju) nalaze na pomoćnom plazmidnom tzv. *vir*-vektoru

(Lee i Gelvin 2008). Binarni vektor pBinSRNA-*CRYPT* sadrži gen *alcR*, koji je pod kontrolom CaMV 35S promotora i *nos* terminatora te sintetički gen *crypt* (O'Donohue i sur. 1995) koji se nalazi pod kontrolom *alcA* promotora i *nos* terminatora (Slika 8). Transformacijski vektor dobiven je modifikacijom binarnog vektora pBinSRNACatN (Syngenta, Berkshire, UK) tako što je gen *Cat* izrezan i zamjenjen sintetičkim genom *crypt*. U usporedbi sa sekvencom prirodnog gena *crypt*, sintetizirani gen *crypt* ima promijenjen nukleotidni slijed koji uključuje restrikcijska mjesta, dok aminokiselinski slijed elicitora nije promijenjen. Genski ekspresijski sustav induciran alkoholom temelji se na *alc* regulonu iz kvasca *A. nidulans* (Felenbok 1991) a sastoji se od dvije komponente: transkripcijskog faktora AlcR koji je kodiran genom *alcR* i od promotora gena *alcA* (*alcA* promotor).



Slika 8. Mapa binarnog vektora pBinSRNA-*CRYPT*. pCaMV 35S: konstitutivni promotor gena za 35S RNA virusa mozaika cvjetače; *alcR*: gen za transkripcijski faktor AlcR; *tnos*: *nos* terminator; *palcA*: promotor alkohol-dehidrogenaze; *crypt*: gen za β -kriptogein; *nptII*: gen za neomicin-fosfotransferazu II (otpornost na aminoglikozidne antibiotike); RB: desna granična sekvenca; LB: lijeva granična sekvenca.

3.2. Metode

3.2.1. Tretman rekombinantnim β -kriptogeinom

Kako bi predvidjeli učinke proteinskog produkta transgena *crypt*, prije transformacije je kosmato korijenje linije OA4 tretirano rekombinantnim β -kriptogeinom. Beta-kriptogein, korišten u pokusu, rekombinantni je protein kodiran sintetičkim genom *crypt*, dobiven pomoću ekspresijskog sustava kvasca *P. pastoris* (O'Donohue i sur. 1995). Iako je nukleotidni slijed sintetiziranog gena *crypt* u usporedbi sa slijedom prirodnog gena *crypt* malo promijenjen, ta promjena nije utjecala na slijed aminokiselina u proteinu. Matična otopina β -kriptogeina ($0.1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$) pripremljena je u vodi te sterilizirana filtriranjem kroz filter veličine pora $0.22 \text{ }\mu\text{m}$. Kosmato je korijenje tretirano 4. dan subkulture dodatkom matične otopine kriptogeina u tekuću hranjivu MS podlogu u konačnoj koncentraciji $62.5 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$. Za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola u tkivu i tekućoj hranjivoj podlozi korijenje je uzorkovano 17. dan subkulture, dok je hranjiva podloga uzorkovana svaka tri dana.

3.2.2. Transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive i indukcija transgenog korijenja

Transformacija lisnih eksplantata ukrasne koprive, indukcija i selekcija transgenog korijenja napravljeni su prema metodi koju su opisali Bauer i sur. (2002). Listovi tromjesečnih biljaka narezani su na eksplantate veličine 1 cm^2 te inkubirani 15 minuta u suspenziji agrobakterija koja je dobivena tako što su bakterije *A. rhizogenes* A4 pBinSRNA-CRYPT iz dvodnevne kulture, uzgojene u tekućoj YEP podlozi, resuspendirane u tekućoj podlozi MS. Kontrolni lisni eksplantati su inkubirani u istoj, autoklaviranoj suspenziji te služe kao kontrola uspješnosti poticanja korijenja na lisnim eksplantatima. Nakon inkubacije, eksplantati su ocijeđeni na sterilnom filter-papiru i inokulirani na krutu MS hranjivu podlogu bez dodatka regulatora rasta, tako da je gornja strana lisne plojke polegnuta na podlogu. Nakon dva dana, eksplantati su 2 sata inkubirani u tekućoj podlozi MS uz dodatak karbenicilina ($500 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) na tresilici (100 rpm), potom su ocijeđeni na sterilnom filter-papiru i subkultivirani na krutu MS hranjivu podlogu s dodatkom karbenicilina ($500 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) te inkubirani u tami na $+25 \text{ }^\circ\text{C}$. Tri tjedna nakon inokulacije, izrasli korijenčići dužine 0.5 cm odrezani su s inokuliranih eksplantata te je svaki pojedini korijenčić prenešen na krutu MS podlogu s dodatkom karbenicilina ($500 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$), kako bi

se eliminirala kontaminacija agrobakterijama. Korijenje je raslo na +25 °C u tami. Nakon dvije trotjedne subkulture, korijenje je subkultivirano na MS podlogu bez dodatka antibiotika.

3.2.3. Kultura biljnog tkiva

Rad s kulturom biljnog tkiva odvijao se u sterilnim uvjetima, uključujući sav laboratorijski pribor i posuđe, otopine i hranjive podloge. Tkivo je presađivano u kabinetu za rad u sterilnim uvjetima s laminarnim protokom zraka, čija je radna površina dezinficirana 70% -tnim etanolom i sterilizirana UV svjetlom.

Transgeno korijenje ukrasne koprive uzgajano je u Petrijevim zdjelicama (Ø 9 cm) na tekućoj (8 mL) MS hranjivoj podlozi u inkubatoru u tami pri +28 °C i krutoj (20 mL) MS podlozi pri +25 °C, bez dodatka regulatora rasta. Kultura transgenog korijenja je na krutoj podlozi održavana subkultiviranjem svakih 6 tjedana, dok je na tekućoj podlozi održavana subkultiviranjem svaka 2 tjedna na svježju podlogu. Korijenje na tekućoj podlozi uzgaja se statično u malo medija što osigurava adekvatnu opskrbljenost tkiva kisikom. Budući da korijenčići rastom pregrađuju odjeljke, tijekom uzgoja sadržaj je u Petrijevim zdjelicama potrebno jednom dnevno promiješati kako bi se homogenizirao sastav podloge.

3.2.4. Izdvajanje plazmidne DNA iz bakterije *A. rhizogenes*

Plazmidna DNA iz bakterijskih stanica izdvojena je pomoću komercijalnog kompleta *PureYield™ Plasmid Miniprep System* prema uputama proizvođača. Sustav omogućava brzo izdvajanje vrlo kvalitetne plazmide DNA pomoću kolonija sa silika membranom.

Jedna bakterijska kolonija inokulirana je u 2 mL LB tekuće hranjive podloge s dodatkom kanamicina ($30 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$) te inkubirana 2 dana pri +28 °C na tresilici (200 rpm). Suspenzija bakterija (0.6 mL) iz prekonocne kulture centrifugirana je 5 min na 5 000 g. Dobiveni talog bakterijskih stanica resuspendiran je u 100 μL pufera za lizu stanica (*Cell Lysis Buffer*) i promiješan inverznim okretanjem mikroeprevete. Po završetku lize stanica, u mikroeprevetu je dodano 350 μL hladne otopine za neutralizaciju (*Neutralization Solution*) te dobro promiješano okretanjem mikroeprevete. Nakon neutralizacije, smjesa je centrifugirana 3 minute na 16 200 g. Dobiveni supernatant prebačen je na mini kolonu

(*PureYield*TM) te centrifugiran 15 sekundi na 16 200 g. Dodatkom 200 μ L otopine za ispiranje (*Endotoxin Removal Wash*) i centrifugiranjem 15 sekundi s kolone su uklonjeni proteini, RNA i endotoksini. Nakon toga je kolona dodatno isprana s 400 μ L otopine za ispiranje (*Column Wash Solution*) uz 30 sekundi centrifugiranja na 16 200 g. Pročišćena plazmidna DNA je s kolonice eluirana pomoću 30 μ L pufera za eluciju (*Elution Buffer*) i centrifugiranjem na 16 200 g 15 sekundi te je pohranjena na -20 °C. Izdvojena plazmidna DNA korištena je kao pozitivna kontrola kod PCR analize.

3.2.5. Izdvajanje genomske DNA iz tkiva transgenog korijenja

Genomska je DNA iz tkiva korijenčića izdvojena pomoću komercijalnog kompleta *DNeasy Plant Mini Kit*, prema uputama proizvođača. Vrškovi korijenčića, dužine 1 cm, su nakon uzorkovanja oprani u sterilnoj dH_2O i posušeni filter-papirom. Sto mg svježeg tkiva zajedno sa čeličnim zrcem (\varnothing 3 mm), stavljeno je u mikroeprijetu volumena 2 mL smrznuto u tekućem dušiku te usitnjavano pomoću homogenizatora *TissueLyser* (Qiagen, Hilden, Njemačka) tijekom 90 sekundi pri vibracijskoj frekvenciji od 25 Hz. Na usitnjeno tkivo dodano je 400 μ L pufera za lizu (*API*) i 4 μ L otopine ribonukleaze A (RNaza A, 100 mg \times mL⁻¹) te je smjesa inkubirana 10 minuta na $+65$ °C kako bi se lizirale stanice i razgradile molekule RNA. Nakon lize tkiva, proteini i ugljikohidrati u lizatu istaloženi su pomoću 130 μ L pufera koji sadrži veliku koncentraciju kaotropne soli (*AP2*). Stanični ostaci i nastali talog uklonjeni su pomoću *QIAshredder* kolonice kratkim centrifugiranjem smjese 2 minute na 16 200 g. Zatim je bistrom lizatu dodan 1.5 volumen pufera za vezanje/etanol (*AP3/E*) kako bi se omogućila adsorpcija DNA na silica membranu. Smjesa je nanešena na kolonu *DNeasy* i centrifugirana 1 minutu na 6 000 g. DNA se veže za membranu dok su proteini i ugljikohidrati isprani dodatkom 500 μ L pufera za ispiranje (*AW*) i centrifugiranjem 1 minutu na 6 000 g, postupak ispiranja je dva puta ponovljen. Pročišćena je DNA s kolonice eluirana pomoću 100 μ L mqH_2O te pohranjena na $+4$ °C.

3.2.6. Lančana reakcija polimerazom

Uspješnost transformacije potvrđena je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) umnažanjem odsječka gena *crypt* veličine 329 bp i gena *orf13* veličine 498 bp. Plazmidna DNA, izdvojena iz bakterije *A. rhizogenes*,

poslužila je kao pozitivna kontrola, dok je genomska DNA, izdvojena iz korijenja divljeg tipa ukrasne koprive, poslužila kao negativna kontrola. Kako bi dokazali odsutnost kontaminacije agrobakterijama u kulturi kosmatog korijenja, reakcijom PCR umnažan je i odsječak gena *virB10* veličine 644 bp. Reakcijska smjesa ukupnog volumena 50 μ L sastojala se od 50 ng kalupa DNA, 0.2 mM smjese svakog dNTP-a, 0.2 μ M svake početnice, 1.0 U GoTaq DNA polimeraze i 1 \times pufera za PCR. Slijedovi oligonukleotidnih početnica navedeni su u Tablici 1. Reakcija PCR odvijala se u 35 ciklusa u uređaju za PCR Eppendorf Mastercycler[®] (Eppendorf, Hauppauge, SAD), a uvjeti reakcije PCR navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti reakcije PCR za umnažanje gena *crypt*, *orf13*, *virB10*.

| Uvjeti reakcije PCR | Temperatura | Vrijeme |
|---------------------------------|---|---------|
| Početna denaturacija | 95 °C | 3 min |
| 35 ciklusa: | | |
| Denaturacija | 95 °C | 45 s |
| Sparivanje početnica | 55 °C (<i>orf13</i> ; <i>crypt</i>) 58 °C (<i>virB10</i>) | 45 s |
| Produljivanje lanca DNA | 72 °C | 1 min |
| Završno produljivanje lanca DNA | 72 °C | 5 min |

3.2.7. Određivanje količine i kakvoće DNA

Masena koncentracija DNA (plazmidne, biljne genomske i cDNA) mjerena je spektrofotometrijski na 260 nm pomoću instrumenta NanoVue (GE Healthcare, Freiburg, Njemačka). Mjerenjem omjera A_{260}/A_{280} dobivena je informacija o čistoći DNA (čista DNA ima omjer od 1.8 do 2.0).

Plazmidna DNA, genomska DNA i PCR produkti analizirani su horizontalnom elektroforezom u agaroznom gelu. Agarozni gel (1%, w/v) za razdvajanje genomske DNA pripremljen je otapanjem agaroze u 1 \times TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0), dok je za razdvajanje PCR produkata korišten 1.5% (w/v) agarozni gel pripremljen u 0.5 \times TBE puferu (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA, pH 8.3). Uzorci DNA su prije nanošenja na gel pomiješani s puferom za nanošenje uzoraka (6 \times) u konačnoj koncentraciji 1 \times . Kao standardi za određivanje duljine odsječaka DNA korišteni su: *Gene RulerTM DNA Ladder Mix*, *Direct Load Step Ladder 50 bp* i *Gene RulerTM 100 bp DNA*

Ladder Plus. Elektroforeza je provedena u kadici za horizontalnu elektroforezu *RunOne™ Electrophoresis Cell* (Embi Tec, San Diego, SAD) u odgovarajućem puferu ($1 \times$ TAE za genomsku DNA i $0.5 \times$ TBE za PCR produkte) pri jakosti električnog polja $5 \text{ V} \times \text{cm}^{-1}$ sve dok se narančasta boja *Orange G* ne približi rubu gela. Elektroforezom se DNA razdvaja na vrpce koje su nakon bojanja gela u otopini etidijeva bromida ($0.5 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$) vizualizirane pomoću UV transiluminatora te dokumentirane fotografiranjem pomoću kamere Kodak EDAS 290 (Eastman Kodak, New Haven, SAD).

3.2.8. Indukcija sinteze β -kriptogeina u transgenom korijenju

Za istraživanje sinteze fenolnih spojeva odabrane su četiri linije transgenog korijenja ukrasne koprive, linija O3, linija O5 i linija O6 koje sadrže gen *crypt* te linija OA4 kao kontrolna linija bez gena *crypt*. Svaka linija predstavlja različiti transformacijski događaj.

Do stavljanja u pokus korjenčići su subkultivirani svaka 2 tjedna. Za provođenje eksperimenta, korijenčići su rasli u dvije faze. U prvoj fazi rasta je oko 200 mg korijenčića subkultivirano na tekuću hranjivu MS podlogu. U ovoj fazi koja je trajala dva tjedna induciran je rast korijenčića, nakon čega su izrasli korijenčići (oko 1 g tkiva) presađeni u 8 mL svježije tekuće MS hranjive podloge. Presađivanjem korijenčića u svježiju podlogu započinje 2. faza rasta, odnosno faza indukcije sekundarnih metabolita. Četvrti dan subkulture (0. dan tretmana = očekivana indukcija gena *crypt*) tkivo je, nakon što se prilagodilo novoj hranjivoj podlozi, tretirano etanolom u konačnoj koncentraciji 1% i 2% kako bi se inducirala ekspresija gena *crypt*. Kontrolno je tkivo tretirano odgovarajućom količinom sterilne diH_2O , volumenom koji odgovara volumenu etanola.

Tkivo i hranjiva podloga za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola i za HPLC analizu uzorkovani su u određenim vremenskim intervalima: neposredno prije tretmana etanolom, zatim 7., 14. i 21. dan nakon indukcije etanolom. U svakoj je vremenskoj točki uzorkovano 250 mg tkiva i 0.2 mL hranjive podloge iz svake Petrijeve zdjelice, dok je za potrebe HPLC analize, 14. dan, uzorkovan 1 mL hranjive podloge. Neposredno nakon uzorkovanja, tekuća je hranjiva podloga centrifugirana 10 min pri 16 200 g kako bi se uklonile zaostale stanice. Svaka istraživana linija transgenog korijenja, u kojoj je ekspresija gena *crypt* inducirana etanolom (1% i 2%), uzgajana je u triplikatu te su eksperimenti ponovljeni tri puta.

3.2.9. Izdvajanje ukupne glasničke RNA iz tkiva transgenog korijenja

Ukupna glasnička RNA (mRNA) izdvojena je pomoću komercijalnog kompleta *Dynabeads® mRNA Direct™ Micro kit* prema uputama proizvođača. Ključnu sastavnicu kompleta čine superparamagnetična polistirenska zrnca s kovalentno vezanim oligo (dT)₂₅ nukleotidnim slijedom (*Dynabeads® Oligo (dT)₂₅*) koji je komplementaran slijedu poli-A repa molekule mRNA, što omogućuje vezanje i izdvajanje vrlo pročišćene mRNA.

Transgeno je korijenje za izdvajanje ukupne mRNA uzorkovano dva tjedna nakon tretmana 1% i 2%-tnim etanolom. Tkivo je oprano u dH₂O, posušeno filter-papirom te je 5 mg prebačeno u mikroeprevetu, smrznuto u tekućem dušiku te usitnjavano drobljenjem mikropistilom u mikroepreveti, stalnim uranjanjem mikroeprevete u dušik kako ne bi došlo do otapanja tkiva. Homogenizacija tkiva mikropistilom nastavljena je i nakon dodatka 100 µL pufera za lizu/vezanje (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM LiCl, 10 mM EDTA (pH 8.0), 1% LiDS, 5 mM ditiotritol). Po završetku lize smjesa je centrifugirana 60 sekundi na 16 200 g. Na 100 µL lizata dodano je 20 µL predhodno pripremljenih zrnaca *Dynabeads Oligo (dT)₂₅* te je smjesa 5 minuta miješana na kotaču kako bi se omogućila hibridizacija mRNA na zrnca. Nakon hibridizacije je mikroepreveta prebačena na magnet (*Dynal MPC*) kako bi se uklonio supernatant. Potom su zrnca ispirana resuspendiranjem u 100 µL pufera za ispiranje *A* (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA, 0.1% LiDS). Postupak ispiranja je ponovljen još jednom, nakon čega su zrnca još dva put isprana puferom za ispiranje *B* (100 µL; 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M LiCl, 1 mM EDTA). Na kraju su zrnca s vezanom mRNA resuspendirana u 100 µL 10 mM Tris-HCl pufera (pH 7.5) kojem je dodan rekombinantni inhibitor RNaza *RnaseOUT™* i čuvana na ledu za RT-PCR. Izdvojena mRNA upotrijebljena je za obrnuto prepisivanje u cDNA, s tim da je prije dodatka RT-PCR smjese potrebno ukloniti Tris-HCl pufer.

3.2.10. Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja

Prisutnost transkripta gena *crypt* u transgenom korijenju tretiranom etanolom (1% i 2%, v/v) je određena metodom lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). Neposredno nakon izdvajanja je mRNA upotrijebljena za obrnuto prepisivanje (engl. *Reverse Transcription*, RT) u komplementarnu DNA (cDNA) nakon čega je uslijedilo umnažanje PCR-om. Obrnuto prepisivanje u cDNA izvedeno je pomoću reverzne transkriptaze *RevertAid™ H Minus M-MuLV* prema uputama proizvođača.

Dio reakcijske smjese za obrnuto prepisivanje mRNA (12.5 μ L), koji se sastojao od izdvojene mRNA i 0.5 μ g oligo d(T)₁₈ početnica inkubiran je 5 minuta na +65 °C kako bi se denaturirale sekundarne strukture unutar molekule RNA. Nakon denaturacije smjesa je naglo ohlađena na ledu te je dodan ostatak reakcijske smjese (7.5 μ L) koji sadrži 1 \times pufer za RT, 20 U inhibitora RNaza *RiboLock*TM, 1 mM smjesu dNTP-a i 200 U reverzne transkriptaze. Slijedila je inkubacija 60 minuta na +42 °C za vrijeme koje se odvijala sinteza cDNA. Nakon sinteze cDNA, reakcija je završena zagrijavanjem reakcijske smjese 10 minuta na +70 °C kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza i denaturirala hibridna molekula RNA/cDNA. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR Eppendorf Mastercycler[®] (Eppendorf, Hauppauge, SAD).

Dobivena cDNA je umnažana u reakciji PCR, koja je izvedena na isti način i pod istim uvjetima kao i reakcija PCR u kojoj je kalup bio genomska DNA (Tablica 3, poglavlje 3.2.6.). U reakcijsku smjesu za PCR (poglavlje 3.2.6.) je kao kalup dodan 1 μ L cDNA. Uspješnost reverzne transkripcije provjerena je umnažanjem beta aktina (β -aktin), koji je poslužio kao unutrašnja kontrola budući je uvijek eksprimiran u biljnim stanicama u stalnoj količini (tzv. *housekeeping gene*). Razlika u veličini odsječka gena β -aktin (s prisutnim intronom, 412 bp) i njegove cDNA (330 bp) je također poslužila za dokazivanje odsutnosti kontaminacije genomskom DNA.

3.2.11. Semi-kvantitativni RT-PCR

Razina ekspresije gena *crypt* procjenjena je semi-kvantitativnim RT-PCR-om. cDNA umnažana je reakcijom PCR korištenjem dva seta početnica, za gen *crypt* i β -aktin. Umnažanje odsječka cDNA β -aktina (130 bp) poslužilo je kao unutrašnja kontrola. Razlika u veličini odsječka gena β -aktin (218 bp) i njegove cDNA poslužila je za dokazivanje odsutnosti kontaminacije genomskom DNA. Optimalni broj ciklusa umnožavanja i količina cDNA, pri kojima se reakcija PCR nalazi u eksponencijalnoj fazi, određeni su u preliminarno napravljenim eksperimentima. Reakcijom PCR su istovremeno umnažane cDNA gena *crypt* i β -aktin u konačnom volumenu reakcijske smjese od 50 μ L koja se sastojala od 300 ng cDNA, 0.2 mM smjese dNTP-a, 5 pmol svake početnice (*crypt* FW, *crypt* REV, β -aktin FW2, β -aktin REV2), 1.0 U *GoTaq* DNA polimeraze i 1 \times pufera za PCR. Slijedovi oligonukleotidnih početnica navedeni su u Tablici 1. Reakcija je prekinuta

u eksponencijalnoj fazi umnažanja, u 24. ciklusu, a uvjeti reakcije PCR navedeni su u Tablici 4.

Nakon elektroforeze je intenzitet vrpce kvantificiran softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD) i normaliziran prema odgovarajućem signalu cDNA β -aktina.

Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za istovremeno umnažanje cDNA gena *crypt* i β -aktin.

| Uvjeti reakcije PCR | Temperatura | Vrijeme |
|---------------------------------|-------------|---------|
| Početna denaturacija | 95 °C | 3 min |
| 24 ciklusa: | | |
| Denaturacija | 95 °C | 45 s |
| Sparivanje početnica | 55 °C | 45 s |
| Produljivanje lanca DNA | 72 °C | 1 min |
| Završno produljivanje lanca DNA | 72 °C | 5 min |

3.2.12. Bioinformatička analiza

Predikcija stanične lokalizacije β -kriptogeina napravljena je različitim bioinformatičkim programima: YLoc (Web 2), TargetP 1.1 (Web 3), WOLF PSORT (Web 4), i MultiLoc (Web 5). Sve navedene predikcije odnose se na biljne stanice. Za predikciju prisutnosti i lokalizacije signalnog peptida korišten je SignalP 4.1 server (Web 6, Petersen i sur. 2011).

3.2.13. Koncentriranje izvanstaničnih proteina

Tekuća je hranjiva podloga za analizu izvanstaničnih proteina uzorkovana je dva tjedna nakon tretmana transgenog korijenja (linija OA4, O3 i O6) 1%-tnim etanolom. Budući je koncentracija proteina u hranjivoj podlozi preniska, proteine je za analizu bilo potrebno koncentrirati. Neposredno nakon uzorkovanja tekuća je podloga centrifugirana 15 minuta na 3 200 g i +4 °C, a zatim filtrirana kroz filter s porama veličine 0.22 μ m kako bi se uklonile zaostale stanice i stanični dijelovi. Koncentriranje proteina iz hranjive podloge provedeno je membranskom ultrafiltracijom u kivetama za filtriranje *Amicon*[®] *Ultra-15*

koje ne propuštaju molekule veće od 3 kDa (engl. *Molecular Weight Cut Off*, MWCO 3 kDa, Merck Millipore, Billerica, SAD). Nakon višestrukog centrifugiranja na 3 000 g tijekom 90 minuta dobiven je uzorak 100 × koncentriranih proteina, koji je u istim kolonama odsoljen ispiranjem u 50 mM kalij-fosfatnom (KP) puferu (50 mM KH₂PO₄, 50 mM K₂HPO₄, pH 7.0).

3.2.14. Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu

Izvanstanični proteini analizirani su diskontinuiranom natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid-gel elektroforezom (engl. *Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, SDS-PAGE). Razdvajanje proteina provedeno je u 4%-tnom gelu za sabijanje i 15%-tnom gelu za razdvajanje metodom po Laemmliju (1970). Nakon pripreme je otopina gela za razdvajanje izlivena u kalup, kojeg čine dvije staklene ploče te je nadsvođena 30% -tnim etanolom kako bi se omogućila polimerizacija gela. Nakon što je polimerizirao, na donji je gel izliven gel za sabijanje u koji je zatim uronjen češalj kako bi se oblikovale jažice u koje nanosimo uzorke. Neposredno prije nanošenja na gel, proteinski su uzorci pomiješani s *Laemmli* puferom (125 mM Tris (pH 6.8), 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) β-merkaptioetanol, 32% (v/v) glicerol, kap bromfenola plavog) u omjeru 4:1 i zagrijavani 5 minuta u termomikseru na +95 °C i 300 rpm, kako bi se proteini denaturirali i povezali sa SDS-om. Nakon kratkog centrifugiranja uzorci su nanešeni u jažice, tako da je u svaku jažicu dodana jednaka masa proteina. U jednu jažicu nanešen je proteinski standard *Precision Plus Protein™ Standard*, koji služi za pokazivanje položaja proteina određene molekularne mase na gelu za vrijeme elektroforeze. Elektroforeza je provedena u kadici za vertikalnu elektroforezu *Mini Vertical Dual Plate Electrophoresis Units* (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) u 1 × puferu za elektroforezu (25 mM Tris, 0.192 M, 10% (w/v) SDS, pH 8.3) pri uvjetima napona od 80 V tijekom prolaska proteina kroz gel za sabijanje (oko 30 minuta), nakon čega je slijedilo povećanje napona na 200 V. Elektroforeza je zaustavljena nakon što je boja bromfenol plavo došla do ruba gela.

Gel za razdvajanje, 15% -tni

| | |
|--|--------|
| deH ₂ O | 2.5 mL |
| 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) | 2.5 mL |
| Akrilamid, 29.2%/Bis-akrilamid, 0.8% (30%AA/Bis) | 5 mL |
| SDS, 10 % | 50 µL |
| APS | 50 µL |
| TEMED | 10 µL |

Gel za sabijanje, 4% -tni

| | |
|--|---------|
| deH ₂ O | 3.05 mL |
| 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) | 1.25 mL |
| Akrilamid, 29.2%/Bis-akrilamid, 0.8% (30%AA/Bis) | 665 µL |
| SDS, 10 % | 50 µL |
| APS | 25 µL |
| TEMED | 5 µL |

3.2.15. Bojenje gelova srebrovim nitratom

Nakon SDS-elektroforeze gelovi su bojeni srebrovim nitratom, metodom koju su opisali Blum i sur. (1987). Gel je nakon elektroforeze 30 minuta fiksiran u smjesi etanola (30%, *v/v*), octene kiseline (12%, *v/v*) i formaldehida ($0.05 \text{ mL} \times \text{L}^{-1}$). Nakon uklanjanja fiksativa ispiranjem tri puta po 10 minuta u 30%-tnom etanolu, gel je obrađen otopinom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ($2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$) tijekom 1 minute. Navedeni predtretman povećava osjetljivost ubrzavanjem redukcije srebra vezanog za proteine. Potom je gel ispran tri puta u diH₂O te je 20 minuta inkubiran u otopini AgNO_3 ($2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$) i formaldehida ($0.75 \text{ mL} \times \text{L}^{-1}$) kako bi se impregnirao srebrom. Nakon ponovnog ispiranja 3 puta u diH₂O, na gel je dodana otopina za razvijanje (Na_2CO_3 , $60 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$; formaldehid, $0.75 \text{ mL} \times \text{L}^{-1}$; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $0.2 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$) pri čemu dolazi do redukcije u metalno srebro. Taloženje srebra zaustavljeno je uklanjanjem otopine za razvijanje i naglim zakiseljavanjem dodatkom stop otopine koju čini etanol (50%, *v/v*) i octena kiselina (12%, *v/v*). Gel je nakon bojenja dokumentiran skeniranjem pomoću skenera HP ScanJet 3400C (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, SAD).

3.2.16. Određivanje indeksa rasta transgenog korijenja

Linije kosmatog korijenja rasle su u dvije faze. Nakon 1. faze indukcije rasta (dva tjedna), izrasli korijenčići su (oko 1 g tkiva) prebačeni na svježju tekuću hranjivu MS podlogu te su 4. dan subkulture tretirani etanolom kako bi se inducirala transkripcija gena *crypt* (2. faza rasta). Budući da je svrha ovog eksperimenta odrediti utjecaj β -kriptogeina na rast transgenog korijenja, indeks rasta (GI) korijenja mjereno je tijekom 2. faze rasta mjerenjem mase svježeg korijenja prije tretmana etanolom i tijekom induksijskog perioda (7. 14. i 21. dan nakon tretmana etanolom). Budući je svaki put 250 mg korijenčića uzorkovano za analizu sadržaja fenola u tkivu, korijenje je vagano prije i nakon uzorkovanja, tako da je bilježena početna i konačna masa svježje tvari. Tkivo je prije vaganja izdvojeno iz tekućeg podloge te posušeno sterilnim filter-papirom. Sva rukovanja tkivom provedena su u laminaru, sa sterilnim priborom. GI izračunat je prema formuli: (konačna masa svježje tvari – početna masa svježje tvari) / početna masa svježje tvari. Početna masa korijenja u svim Petrijevim zdjelicama bila je oko 1 g u 8 mL tekuće podloge.

3.2.17. Priprema metanolnog ekstrakta i određivanje ukupnih topljivih fenola u tkivu i tekućoj hranjivoj podlozi

Uzorkovani korijenčići oprani su u destiliranoj vodi, posušeni papirnatim ubrusom te usitnjavani u fini prah pomoću tarionika i tučka, uz opetovano zalijevanje tekućim dušikom. Ukupni topljivi fenoli ekstrahirani su iz 100 mg svježeg tkiva pomoću 1 mL 80% (v/v) metanola 30 minuta u ultrazvučnoj kupelji pri +80 °C. Ekstakti su zatim centrifugirani 20 minuta na 16 200 g, a dobiveni je supernatant odvojen za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola i HPLC analizu.

Sadržaj ukupnih topljivih fenola u ekstraktu tkiva i tekućoj hranjivoj podlozi određen je metodom po Folin-Ciocalteuu (Singleton i Rossi 1965). Metoda se temelji na oksidaciji fenolnih spojeva dodatkom Folin - Ciocalteau (FC) reagensa (kompleks fosfomolibdenske-fosfovolframske kiseline) pri čemu nastaje plavo obojeni produkt. U mikroeprovete je redom pipetirano 20 μ L metanolnog ekstrakta tkiva (ili 200 μ L tekuće podloge), voda do 1.6 mL i 100 μ L FC reagensa te promiješano na vrtložnoj miješalici. Nakon 5 minuta inkubacije u reakcijsku je smjesu dodano 300 μ L zasićene otopine Na_2CO_3 . Smjesa je nakon miješanja inkubirana u vodenoj kupelji 60 minuta na +37 °C. Po

završetku inkubacije, spektrofotometrijski je mjerena apsorbancija pri valnoj duljini od 765 nm u odnosu na slijepu probu. Kao standard upotrijebljena je galna kiselina (GA), a koncentracija ukupnih fenola određena je preračunavanjem pomoću standardne krivulje za GA, odnosno dobivene jednadžbe pravca. Sadržaj ukupnih topljivih fenolnih spojeva u svježem tkivu i tekućoj podlozi izražen je u mg ekvivalenta galne kiseline (GAE) po gramu svježe tvari ($\text{mg (GAE)} \times \text{g}^{-1}_{\text{sv.tv.}}$), odnosno u mg GAE po mililitru hranjive podloge ($\text{mg (GAE)} \times \text{mL}^{-1}_{\text{podloge}}$).

3.2.18. Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Tekuća hranjiva podloga za HPLC analizu uzorkovana je 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* u tkivu etanolom. Uzorkovana podloga centrifugirana je 10 minuta na 18 000 g kako bi se ukonili ostaci stanica. Za ekstrakciju na čvrstoj fazi (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) i HPLC analizu, po tri replike uzorkovane tekuće podloge, unutar svakog nezavisnog eksperimenta su spojene u jedan uzorak. Fenolni spojevi iz hranjive podloge koncentrirani su ekstrakcijom na čvrstoj fazi u kolonicama C18 *Extend Volume* (500 mg, Alltech, Deerfield, SAD). Prije upotrebe je kolona ekvilibrirana s 3 mL metanola, nakon čega je isprana s 3 mL diH₂O. Na ekvilibriranu kolonu nanešen je uzorak tekuće podloge koji je kroz kolonu protisnut pomoću vakuuma. Fenolni spojevi vezani na koloni pročišćeni su ispiranjem s diH₂O, nakon čega su eluirani pomoću 1 mL 80% (v/v) metanola. Prikupljeni eluati koji sadrže pročišćene i koncentrirane fenolne spojeve su zatim kvalitativno i kvantitativno analizirani HPLC-om.

3.2.19. Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti

Identifikacija i kvantitativna analiza ružmarinske i kavene kiseline u metanolnim ekstraktima određena je tekućinskom kromatografijom visoke učinkovitosti pomoću instrumenta Perkin Elmer Series 200 opremljenog s vakuumskim degaserom, kvartarnom pumpom, automatskim sustavom za uzimanje uzoraka i UV-VIS detektorom s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD). Dobiveni su podaci analizirani programskim softverom Total Chrome workstation 6.2.1. Razdvajanje fenolnih kiselina provedeno je reverzno-faznom kromatografijom, na Zorbax ODS C-18 koloni (250 mm × 4.6 mm, čestice sorbensa promjera 5 μm; Bischoff, Leonberg, Njemačka) s predkolonom Zorbax

(20 mm × 4.0 mm, čestice sorbensa promjera 5 μm; Bischoff, Leonberg, Njemačka). Mobilna se faza sastojala od 0.026% (v/v) H₃PO₄ u HPLC vodi (otapalo A), i 100% metanola (otapalo B). Analizirano je po 40 μL metanolnog ekstrakta, a spojevi su razdvojeni na temelju razlike u hidrofobnosti izokratnim elucijskim programom koji uključuje: razdvajanje s 35% otapala B u otapalu A 14 minuta, zatim 11 minuta s 55% otapala B u otapalu A, uz stalni protok od 1 mL × min⁻¹. Apsorbancija efluenta pratila se pri valnoj duljini od 330 nm. RA i CAF identificirane su usporedbom vremena retencije i UV-spektra s odgovarajućim referentnim standardima. Sadržaj RA i CAF određen je na osnovu integriranih površina ispod svakog signala te izračunat iz jednadžbe baždarnog pravca standardnih spojeva (RA i CAF). Standardna je krivulja pripremljena uz različite koncentracije standarda, a prikazuje ovisnost površine pika i koncentracije standarda.

3.2.20. Fluorescentna mikroskopija

Za vizualizaciju fenola *in vivo* u netretiranom i etanolom (1%) tretiranom svježem korijenju korišten je fluorescencijski mikroskop Axiovert 200M sa popratnim softverom AxioVision 4.5. Preparati su analizirani korištenjem objektiva Fluar 10×/0.50, seta filtera 10 (ekscitacija BP 450/490 i emisija BP 515-565). Sve su slike snimljene pod istim uvjetima ekspozicije pomoću kamere AxioCam (Zeiss, Göttingen, Njemačka).

3.2.21. Antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive

Za istraživanje oksidacijskog/antioksidacijskog statusa odabrane su tri linije transgenog korijenja ukrasne koprive, linija O3 i linija O6 koje sadrže gen *crypt* te linija OA4 kao kontrolna linija bez gena *crypt*. Nakon dva tjedna rasta je oko 1 g tkiva subkultivirano u 8 mL svježe tekuće MS hranidbene podloge, te nakon 4 dana subkulture tretirano etanolom u konačnoj koncentraciji 0.1% i 1%. Budući da je u predhodnom pokusu pokazano da 2% -tni etanol *per se* utječe na permeabilnost membrane, tretman ovom koncentracijom izostavljen je u ovom pokusu. Koncentracija etanola od 0.1% odabrana je kako bi se ustanovilo može li indukcija i 10 × manjom koncentracijom etanola potaknuti antioksidacijski odgovor transgenog korijenja (preliminarnim pokusom pokazano je kako ova koncentracija etanola potiče ekspresiju gena *crypt*). Kontrolno je tkivo tretirano odgovarajućim volumenom sterilne dH₂O. Transgeno je korijenje za

određivanje sadržaja vodikova peroksida (H_2O_2) i malondialdehida (MDA) te za ekstrakciju ukupnih proteina uzorkovano u određenim vremenskim intervalima: neposredno prije tretmana te 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom. Vremenski intervali (7. i 14. dan uzorkovanja) odabrani su s obzirom na rezultate dobivene u predhodnom pokusu. Osim toga, uzorkovanje 3. dan nakon tretmana dodano je kako bi se ustanovilo dolazi li ranije do antioksidativnog odgovora korijenja na endogeno sintetiziran β -kriptogein. Razlog zbog kojeg je izostavljeno uzorkovanje 21. dan je smanjen sadržaj fenolnih spojeva, do kojeg dolazi vjerojatno zbog starosti tkiva te uslijed nedostatka nutrijenata.

Kao pokazatelji oksidacijskog stresa u transgenom su korijenju spektrofotometrijski određivani količina MDA i količina H_2O_2 . Navedeni pokazatelji oksidacijskog stresa mjereni su neposredno nakon uzorkovanja korijenčića. Mjerenja su provedena na UV-VIS spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2 (PerkinElmer, Waltham, SAD).

Antioksidacijski status određen je spektrofotometrijski, mjerenjem aktivnosti enzima NADPH-oksidaze (NOX), katalaze (CAT), superoksid-dismutaze (SOD) i nespecifičnih gvajakol-peroksidaza (GPOD) u proteinskim ekstraktima. Mjerenja aktivnosti enzima provedena su na UV-VIS spektrofotometru Analytic jena (Analytic Jena AG, Jena, Njemačka).

Ukupna, odnosno specifična aktivnost enzima NOX, CAT i GPOD izračunata je prema formuli:

$$UA [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{ST}}^{-1}] = \frac{dA/dt \cdot V_{\text{RS}} \cdot V_{\text{U}}}{\varepsilon \cdot V_{\text{A}} \cdot m_{\text{ST}}}$$

$$SA [\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot.}}^{-1}] = \frac{UA}{[P]}$$

pri čemu je:

UA – ukupna aktivnost enzima

SA – specifična aktivnost enzima

dA/dt – srednja vrijednost promjene apsorbancije u određenom vremenskom intervalu

V_{RS} – volumen reakcijske smjese

V_U – ukupni volumen proteinskog ekstrakta

ε – ekstinkcijski koeficijent

V_A – volumen mjerenog alikvota

m_{ST} – masa svježe tvari

[P] – sadržaj proteina ($\text{mg}_{\text{proteina}} \times \text{g}^{-1}_{\text{sv. tv.}}$)

3.2.21.1. Određivanje količine vodikova peroksida

Količina vodikovog peroksida (H_2O_2) u transgenom korijenju određena je metodom koju su opisali Mukherejee i Choudhuri (1983). Uzorkovano je korijenje od ostataka hranjive podloge oprano u destiliranoj vodi, posušeno papirnatim ubrusom te usitnjavano u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika. Iz usitnjenog je tkiva (200 mg) H_2O_2 ekstrahirano 15 minuta u 1 mL ledeno-hladnog acetona. Slijepa proba sastojala se od 1 mL acetona bez tkiva. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 6 000 g i +4 °C, odvojenom je supernatantu dodano 400 μL titanovog reagensa i 500 μL NH_4OH (konc.). Dodatkom titanovog reagensa i NH_4OH dolazi do egzotermne reakcije prilikom koje nastaje kompleks titan-peroksida. Istaloženi titan-peroksid odvojen je centrifugiranjem 10 minuta na 15 000 g i +4 °C te otapan u 1 mL 2 M H_2SO_4 . Nakon ponovljenog centrifugiranja, u supernatantu je mjerena apsorbancija dobivenog kompleksa titan-peroksida pri valnoj duljini od 415 nm. Količina H_2O_2 izračunata je iz standardne krivulje dobivene s poznatim koncentracijama H_2O_2 te su konačni rezultati izraženi u μmol po gramu svježe tvari ($\mu\text{mol} \times \text{g}^{-1}_{\text{sv.tv.}}$).

3.2.21.2. Određivanje količine malondialdehida

Razina lipidne peroksidacije (LPO) u transgenom korijenju određena je metodom po Vermau i Dubeyu (2003), mjerenjem reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS), uglavnom malondialdehida (MDA). Uzorkovano je korijenje od ostataka hranjive podloge oprano u destiliranoj vodi, posušeno papirnatim ubrusom te usitnjavano u tekućem dušiku pomoću tučka i tarionika. Usitnjeno je tkivo (200 mg) 15 minuta ekstrahirano u 1 mL 0.1% (w/v) trikloroetene kiseline (TCA). Nakon centrifugiranja

homogenata 5 minuta pri 6 000 g na +4 °C, na 0.5 mL dobivenog supernatanta dodan je 1 mL reagensa za određivanje MDA (0.5% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 20% (w/v) otopini TCA). Kao slijepa proba koristila se reakcijska smjesa (0.5 mL 0.1% TCA i 1 mL reagensa TCA/TBA). Reakcijska je smjesa inkubirana 30 minuta u vodenoj kupelji na +95 °C, nakon čega je reakcija zaustavljena hlađenjem u ledenoj kupelji te centrifugirana 15 minuta na 18 000 g i +4 °C. Tijekom zagrijavanja kisele reakcijske smjese lipidni peroksidi se raspadaju, pri čemu nastaje MDA koji reagira s TBA, a intenzitet nastalog crvenog obojenja određen je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije pri 532 nm i 600 nm. Apsorbancija pri 600 nm oduzima se od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina MDA izračunata je na temelju ekstinkcijskog koeficienta ($\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) i izražena u nmol po gramu svježe tvari ($\text{nmol} \times \text{g}^{-1}_{\text{sv.tv.}}$).

3.2.21.3. Ekstrakcija ukupnih topljivih proteina

Uzorkovani korijenčići oprani su u destiliranoj vodi, posušeni papirnatim ubrusom te usitnjavani u tarioniku pomoću tekućeg dušika uz dodatak polivinil-polipirrolidona (PVPP, služi za uklanjanje fenolnih spojeva iz biljnog ekstrakta). Iz usitnjenog su svježeg tkiva (0.3 g) proteini ekstrahirani 15 minuta na ledu uz dodatak 1 mL hladnog pufera za ekstrakciju (100 mM KH_2PO_4 , 100 mM K_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.0). Za određivanje aktivnosti enzima NADPH-oksidade i superoksid-dismutaze homogenati su sonicirani u tri ciklusa po 30 sekundi, uz 50% amplitude, tijekom 15 minuta ekstrakcije na ledu. Homogenati su zatim centrifugirani 15 minuta na 22 000 g i +4 °C. Dobiveni su supernatanti služili za trenutačno određivanje koncentracije proteina i mjerenje aktivnosti enzima NADPH-oksidade, katalaze, gvajakol-peroksidaza i superoksid-dismutaze.

3.2.21.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Bradfordu (1967). Postupak se temelji na pomaku maksimuma apsorbancije, od 465 nm na 595 nm, do kojeg dolazi u kiseloj otopini, kada se boja Coomassie briljant plavo (CBB) veže na proteine. Razrijeđeni je proteinski ekstrakt (100 μL) pomiješan s 1 mL Bradford reagensa (100 mg CBB G-250, 50 mL etanola, 100 mL 85% fosforne kiseline, dH_2O do 1 L) te inkubiran najmanje 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, intenzitet

obojenja otopine izmjeren je pri valnoj duljini 595 nm na spektrofotometru Perkin Elmer Lambda 2 (PerkinElmer, Waltham, SAD). Kao standard upotrijebljen je albumin govedeg seruma (BSA) u području koncentracija 0.01 – 0.15 mg × mL⁻¹. Na temelju vrijednosti apsorbanacije poznatih koncentracija BSA dobiva se standardna krivulja iz koje se ekstrapolira koncentracija proteina u uzorku. Uzorci standardne otopine, kao i otopine uzoraka, priređeni su u triplikatu.

3.2.21.5. Određivanje aktivnosti NADPH-oksidge

Aktivnost NADPH-oksidge (NOX, EC 1.6.3.1) u proteinskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskom metodom po Askerlundu (1987). U kvarcnu je kivetu redom dodavano 580 µL 50 mM KP-pufera, 300 µL 150 µM NADPH, 100 µL 10 µM KCN-a. Reakcija započinje dodatkom 20 µL proteinskog ekstrakta. Pad apsorbanacije, do kojeg dolazi uslijed oksidacije NADPH, mjeren je svakih 10 sekundi tijekom 1 minute pri valnoj duljini od 340 nm. Svaki je uzorak mjeren u triplikatu. Specifična aktivnost NADPH oksidge izražena je kao količina oksidiranog NADP⁺ u µmol po minuti po miligramu proteina (µmol NADP⁺ × min⁻¹ × mg⁻¹ proteina) koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti NOX po miligramu proteina ($U \text{ NOX} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

3.2.21.6. Određivanje aktivnosti superoksid-dismutaze

Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD, EC 1.15.1.1) u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Giannopolitisu i Riesu (1977). Metoda se temelji na upotrebi nitro-plavog tetrazolijskog klorida (NBT) kao supstrata. U prisutnosti superoksidnih radikala, NBT se reducira u plavo obojen formazan sa apsorpcijskim maksimumom pri valnoj duljini od 560 nm. U prisutnosti SOD, redukcija NBT je inhibirana. Reakcijski puffer za mjerenje aktivnosti SOD sadržavao je 50 mM KP-puffer (pH 7.8), 0.1 mM EDTA, 13 mM metionin i 75 µM NBT. Za izradu krivulje aktivnosti različita razrijeđenja proteinskog ekstrakta pripremljena su miješanjem ekstrakta (10-50 µL) i pufera za ekstrakciju proteina do ukupnog volumena od 100 µL. Za svaki je ekstrakt potrebno napraviti novu krivulju enzimske aktivnosti. U kivetu s 900 µL reakcijskog pufera dodano je 100 µL razrijeđenog proteinskog ekstrakta i 2 µM riboflavina. Enzimska reakcija

započinje stavljanjem reakcijske smjese pod izvor svjetlosti kojeg čini lampa od 36 W. Nakon 10 minuta, reakcija je zaustavljena gašenjem lampe te je spektrofotometrijski mjerena apsorbancija za svaki uzorak. Jedna jedinica aktivnosti SOD jednaka je količini enzima potrebnog za 50% inhibicije redukcije NBT-a. Specifična aktivnost SOD izražena je kao jedinica aktivnosti SOD po miligramu proteina ($U \text{ SOD} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$).

3.2.21.7. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT, EC 1.11.1.6) u proteinskim ekstraktima određena je spektrofotometrijskom metodom po Aebiu (1984). Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti CAT sadrži 50 mM KP-pufer (pH 7.0) i 10 mM H_2O_2 . U kvarcnu kivetu s 1950 μL reakcijskog pufera dodano je 50 μL enzimskog ekstrakta, čime započinje enzimska reakcija. Pad apsorbancije, uslijed razgradnje H_2O_2 , mjeren je svakih 10 sekundi tijekom 1 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Svaki je uzorak mjeren u triplikatu. Specifična aktivnost CAT izražena je kao količina razgrađenog H_2O_2 u μmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol} \text{ H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 43.6 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti CAT po miligramu proteina ($U \text{ CAT} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

3.2.21.8. Određivanje aktivnosti nespecifičnih gvajakol-peroksidaza

Aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOD, EC 1.11.1.7) u proteinskim ekstraktima određena je metodom po Siegelu i Galstonu (1967). Reakcijski pufer za mjerenje aktivnosti GPOD sadrži 18 mM gvajakol i 5 mM H_2O_2 u KP-puferu (pH 7.0). U staklenu je kivetu s 950 μL reakcijskog pufera dodano 50 μL proteinskog ekstrakta, čime započinje enzimska reakcija. Porast apsorbancije mjeren je svake sekunde tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 470 nm. Do porasta apsorbancije dolazi uslijed oksidacije gvajakola pri čemu nastaje smeđe obojen produkt tetragvajakol. Svaki je uzorak mjeren u triplikatu. Specifična aktivnost GPOD izražena je kao količina nastalog tetragvajakola u μmol po minuti po miligramu proteina ($\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$) koristeći ekstinkcijski koeficijent ($\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), odnosno u jedinicama aktivnosti GPOD po miligramu proteina ($U \text{ GPOD} \times \text{mg}^{-1} \text{ proteina}$; $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$).

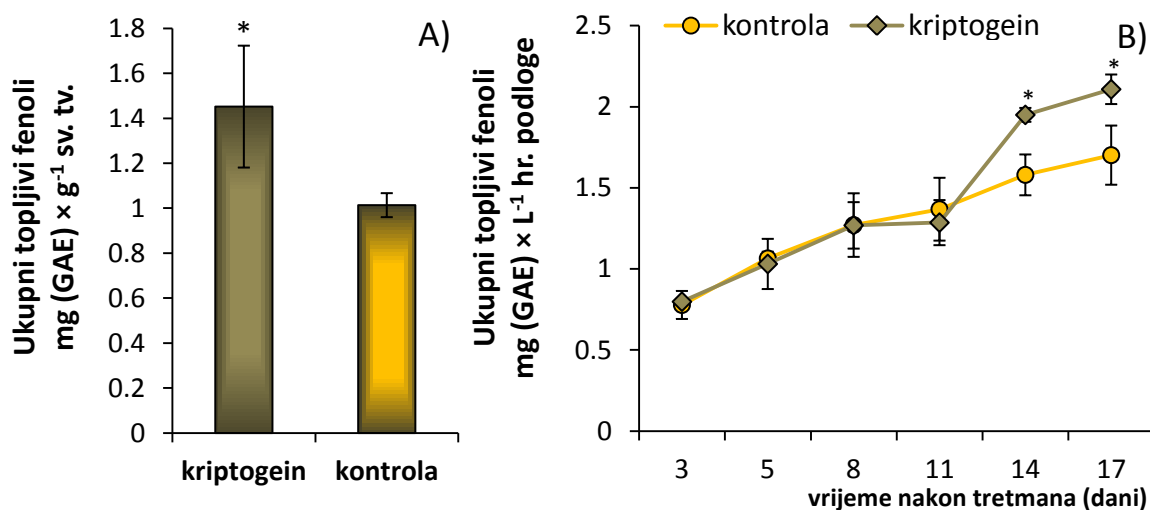
3.2.22. Statistička obrada podataka

Svi su eksperimenti ponovljeni tri puta i svi uzorci uzimani u triplikatu (iz tri Petrijeve zdjelice). Podaci dobiveni u ovom radu obrađeni su u statističkom programu STATISTICA 7.0 (Statsoft, Inc, Tulsa, SAD). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Razlike između srednjih vrijednosti dviju skupina podataka utvrđene su pomoću t-testa, dok su razlike između srednjih vrijednosti kontrole i tretmana (više skupina podataka) utvrđene pomoću analize varijance s jednim promjenjivim faktorom (*one-way* ANOVA). Nakon što je utvrđeno postojanje razlika, provedeno je *post hoc* testiranje pomoću testa Newman-Keuls (Newman 1939, Keuls 1952) kako bi odredili koje se skupine međusobno razlikuju. Svi testovi provedeni su uz razinu značajnosti od 5%.

4. REZULTATI

4.1. Učinak β -kriptogaina na sadržaj ukupnih topljivih fenola u tkivu i hranjivoj podlozi kosmatog korijenja ukrasne koprive

Kako bi predvidjela učinke proteinskog produkta transgena *crypt* na sintezu fenola, kosmato korijenje ukrasne koprive (linija OA4) tretirano je rekombinantnim β -kriptogeinom. Prema rezultatima t-testa, tretman β -kriptogeinom značajno je stimulirao sintezu ukupnih topljivih fenola u tkivu kosmatog korijenja ($P = 0.044$, Slika 9A). Osim toga, tretman β -kriptogeinom stimulirao je i sekreciju fenola u tekuću hranjivu podlogu. Značajno veći sadržaj ukupnih topljivih fenola u tekućoj podlozi, u odnosu na podlogu u kojoj je raslo kontrolno korijenje tretirano vodom, zabilježen je u stacionarnoj fazi rasta korijenja, 14. ($P = 0.0054$) i 17. ($P = 0.0022$) dan subkulture (Slika 9B).

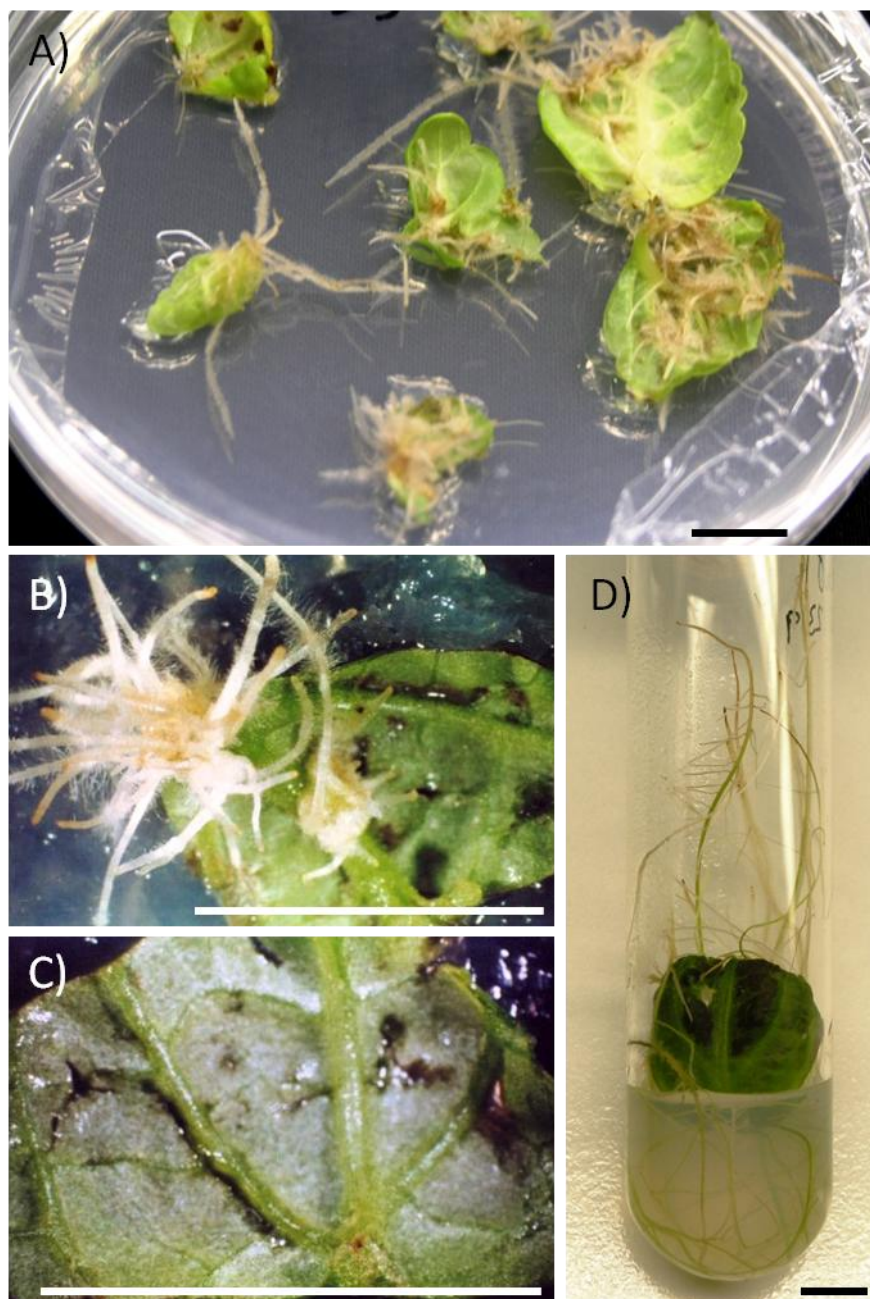


Slika 9. Učinak tretmana β -kriptogeinom na sadržaj ukupnih topljivih fenola u tkivu (A) i tekućoj hranjivoj podlozi (B) kosmatog korijenja ukrasne koprive. Kosmato korijenje linije OA4 (bez gena *crypt*) tretirano je 4. dan subkulture rekombinantnim β -kriptogeinom. Za određivanje sadržaja ukupnih topljivih fenola u tkivu i tekućoj hranjivoj podlozi korijenje je uzorkovano 17. dan subkulture, dok je hranjiva podloga uzorkovana svaka tri dana. Rezultati (šest ponavljanja) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Zvezdice označavaju statistički značajne razlike utvrđene t-testom (A), odnosno Newman-Keuls testom (B) uz razinu značajnosti od 5%.

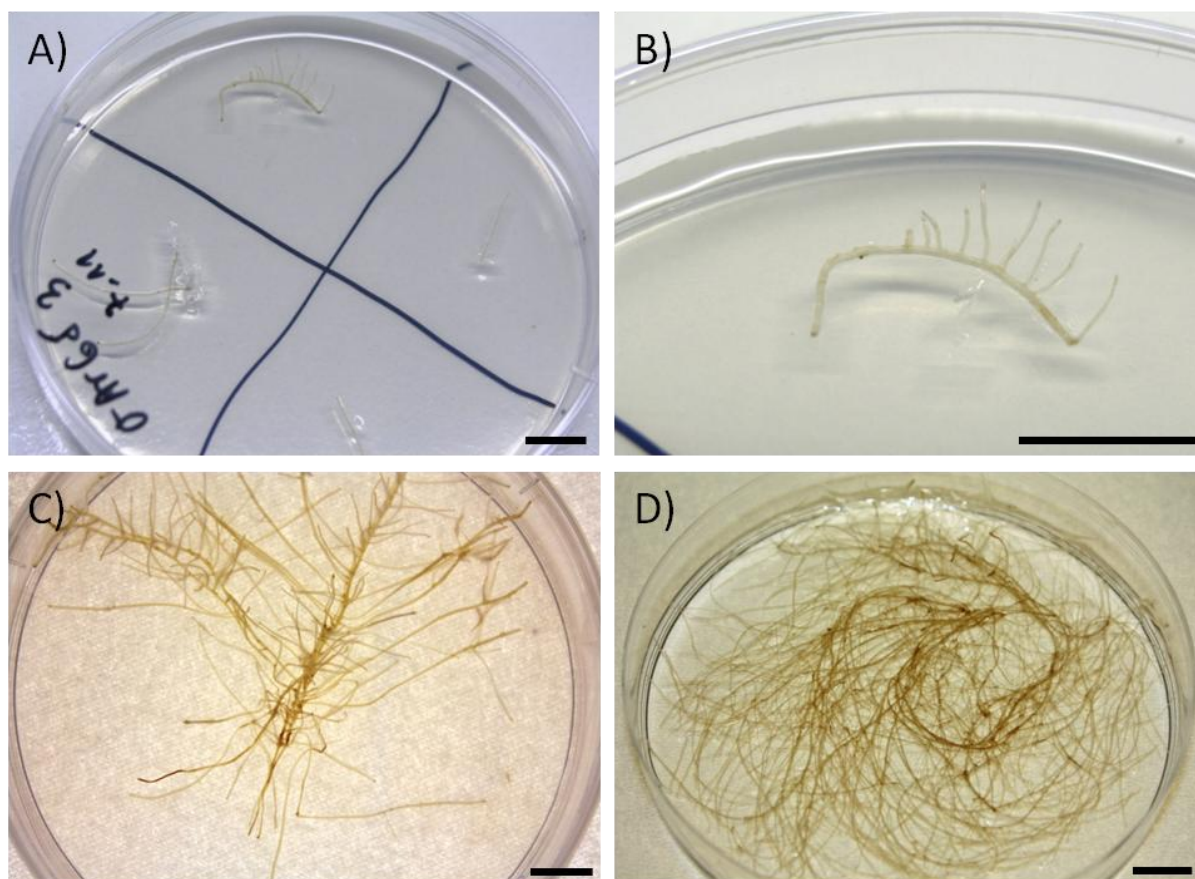
4.2. Uspostavljanje kulture transgenog korijenja ukrasne koprive

Dva tjedna nakon inkubacije lisnih eksplantata i bakterija *A. rhizogenes* s transformacijskim vektorom pBinSRNA-CRYPT, na rubovima lisnih eksplantata počeli su rasti korijenčići (Slika 10A). Korijenje se razvilo na svim inokuliranim eksplantatima kultiviranim na MS podlozi (bez regulatora rasta, Slika 10B), dok se nije razvilo na neinficiranim kontrolnim eksplantatima (Slika 10C). Na svakom pojedinom eksplantatu regenerirano je od 10 do 20 korijenčića (Slika 10B). Tri tjedna nakon inokulacije, izrasli korijenčići dužine 0.5 cm odrezani su s eksplantata te je svaki pojedini korjenčić prenešen i samostalno kultiviran na svježoj MS hranjivoj podlozi (Slika 11A). Svaki korjenčić predstavlja jedan transformacijski događaj, odnosno jednu transgenu liniju korijenja (Slika 11B). Najveći problem u dobivanju trajne kulture transgenog korijenja bio je preživljavanje korijenčića nakon eksplantacije. Preko 98% induciranih korijenčića nekrotiziralo je nakon što su odrezani s lisnih eksplantata i samostalno kultivirani na hranjivoj podlozi.

Kako bi se otklonila kontaminacija agrobakterijama, korijenje je još dva puta u razdoblju od 6 tjedana subkultivirano na MS hranjivu podlogu s dodatkom karbenicilina ($500 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$). Od velikog broja induciranih korijenčića odabrane su one linije koje su imale veći indeks rasta i čije se korijensko tkivo dovoljno razraslo kako bi se moglo subkultivirati u tekuću hranjivu podlogu. Od više desetaka ustaljenih linija za određivanje učinkovitosti gena *crypt* na sintezu fenolnih spojeva odabrane su tri transgene linije s fenotipom tipičnim za kosmato korijenje - linija O3, linija O5 i linija O6 (Slika 11C, D). Odabrane se transgene linije nisu fenotipski razlikovale od OA4 kontrolne linije (bez *crypt* gena), kao niti međusobno.



Slika 10. Indukcija korijenja na eksplantatima listova ukrasne koprive na hranjivoj MS podlozi s dodatkom $500 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ karbenicilina, 2 tjedna nakon inkubacije s bakterijama *A. rhizogenes* soja A4 s transformacijskim vektorom pBinSRNA-CRYPT. A) Inducirani korijenčići na MS krutoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici; B) detalj eksplantata s preko 20 induciranih korijenčića; C) kontrolni eksplantat; D) inducirani korijenčići - izvedba u epruveti s rubnim dijelom eksplantata postavljenim na MS podlogu. Skala iznosi 1 cm.

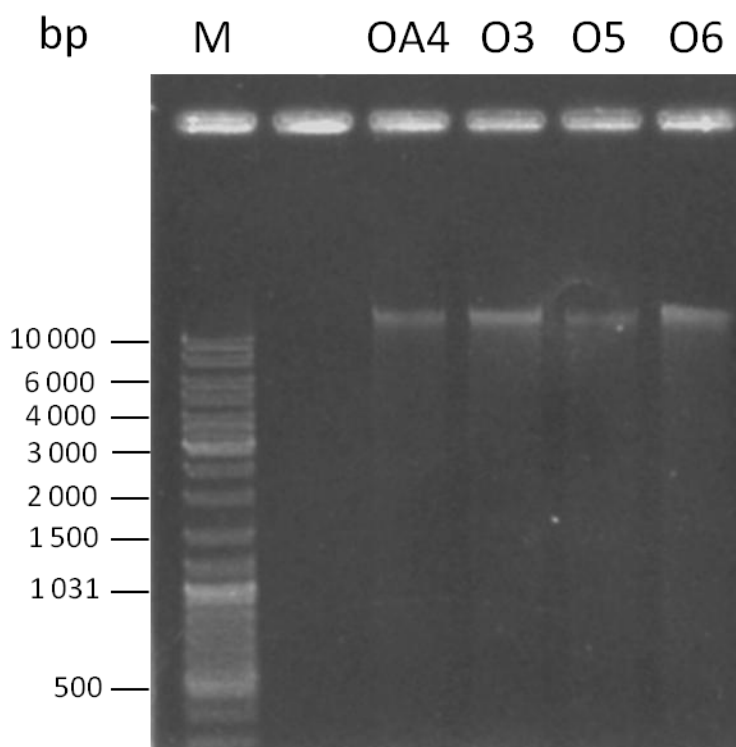


Slika 11. A) Samostalno kultivirani korijenčići na MS hranjivoj podlozi, odrezani s listnih eksplantata ukrasne koprive tri tjedna nakon inokulacije; B) svaki korijenčić predstavlja jedan transformacijski događaj, odnosno jednu transgenu liniju korijenja; C) uzgoj transgenog korijenja na krutoj MS hranjivoj podlozi (linija O6); D) uzgoj transgenog korijenja na tekućoj MS hranjivoj podlozi (linija O6). Skala iznosi 1 cm.

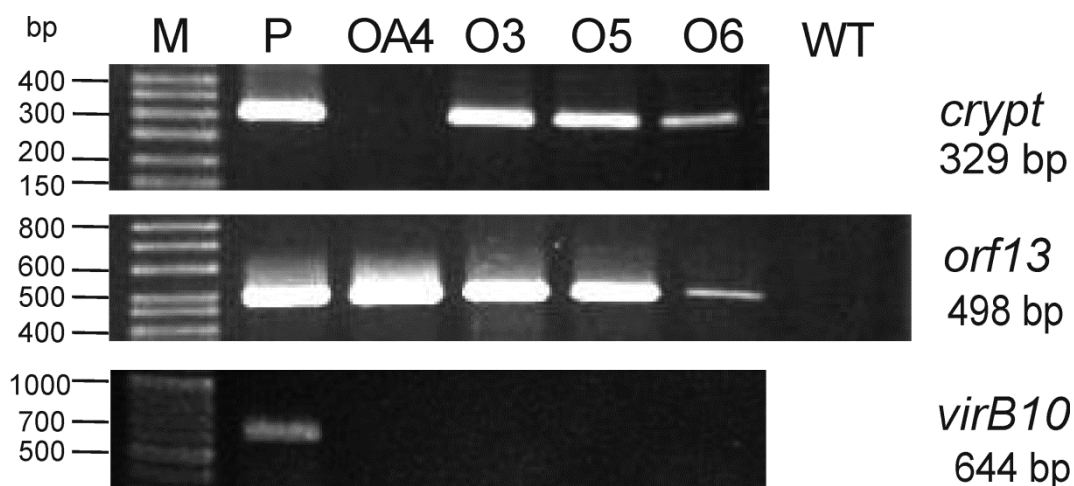
4.3. Gen *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive

Genetička transformacija transgenom *crypt* potvrđena je metodom lančane reakcije polimerazom nakon izolacije genomske DNA (Slika 12). Slika 13 prikazuje produkte umnažanja koji su bili vidljivi nakon elektroforeze u agaroznom gelu i bojanja etidijevim bromidom. Uspješnost transformacije potvrđena je u linija O3, O5 i O6 umnažanjem gena *crypt* (329 bp) i odsječka gena *orf13* (498 bp, Slika 13). Budući da je gen *orf13* odgovoran za proliferaciju korijenčića dokazan je i u linije OA4, dok u iste linije gen *crypt* nije prisutan pa se nije niti umnožio. Odsutnost gena *orf13* u korijenju ukrasne koprive divljeg tipa potvrđuje da ovo korijenje nije transformirano. Stoga nije bilo potrebe za umnažanjem gena *crypt* i *virB10* u ovom uzorku. Odsutnost agrobakterija u transformiranom korijenju

dokazana je umnažanjem odsječka gena *virB10* (644 bp, Slika 13), koji je umnožen samo na kalupu plazmidne DNA izolirane iz bakterije *A. rhizogenes* soja A4 (pozitivna kontrola). Negativni rezultat umnažanja gena *virB10* kao i aksenični rast korijenja na YEP podlozi potvrdili su aseptičnost kulture kosmatog korijenja.



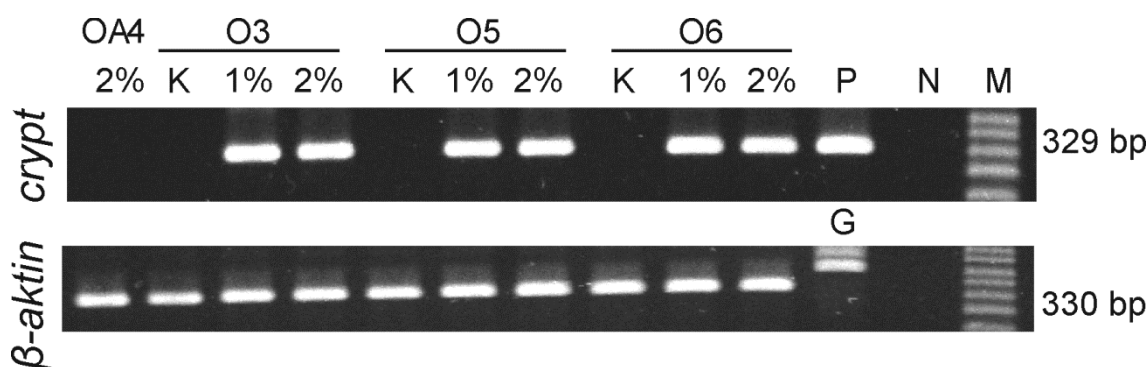
Slika 12. Genomska DNA izolirana iz transgenog korijenja ukrasne koprive linije OA4 te linija O3, O5 i O6. M: standard duljine odsječaka DNA (*Gene RulerTM DNA Ladder Mix, ready-to-use*).



Slika 13. Umnažanje gena *crypt*, *orf13* i *virB10* lančanom reakcijom polimerazom na kalupu genomske DNA linije OA4, linije O3, linije O5, linije O6 i normalnog korijenja ukrasne koprive (WT). P: pozitivna kontrola, plazmidna DNA bakterije *A. rhizogenes* soja A4 s binarnim vektorom pBinSRNA-CRYPT; M: standard duljine odsječaka DNA (*Direct Load Step Ladder*, 50 bp; *Gene RulerTM 100 bp DNA Ladder Plus*).

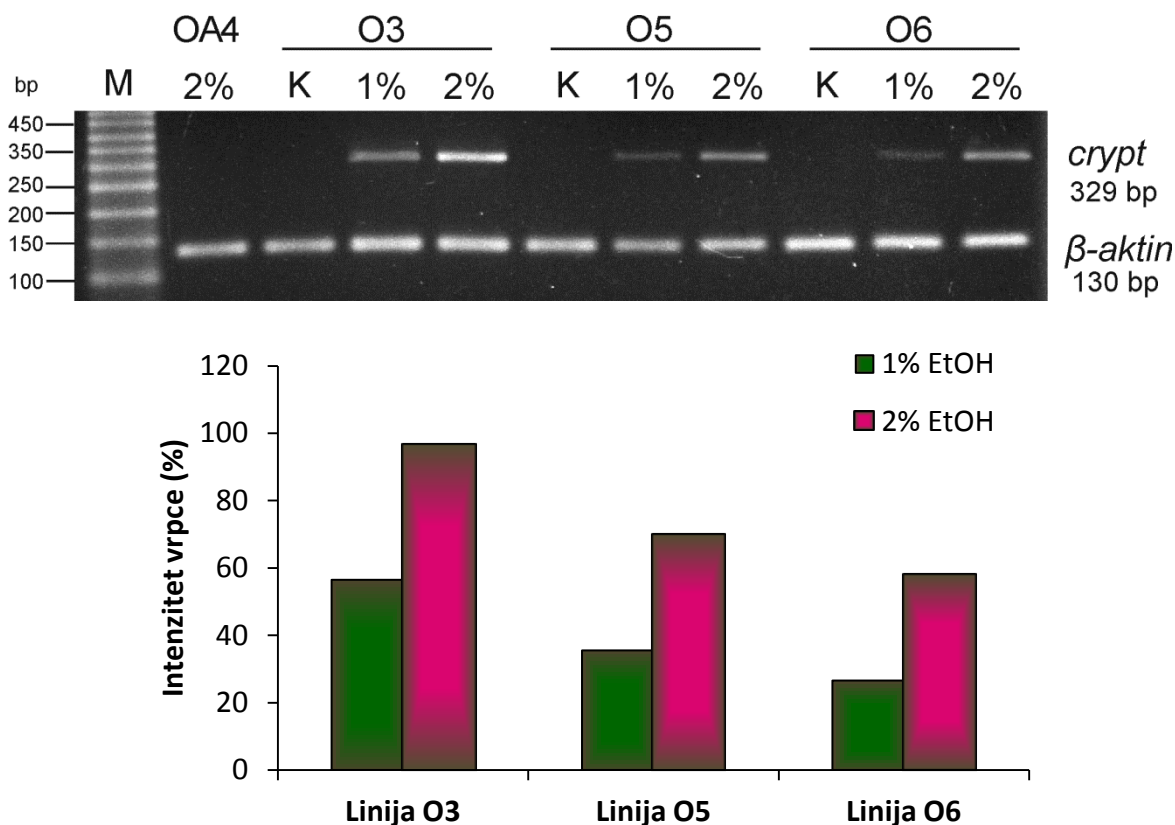
4.4. Ekspresija gena *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive

Prisutnost transkripta gena *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive određena je metodom lančane reakcije polimerazom nakon obrnutog prepisivanja. Slika 14 prikazuje produkte umnažanja koji su bili vidljivi nakon elektroforeze u agaroznom gelu i bojanja etidijevim bromidom. Analizom produkata reakcije PCR utvrđena je prisutnost transkripta u svim ispitivanim *crypt*-linijama tretiranim etanolom (1% i 2%), dok u korijenju tretiranom vodom nije došlo do ekspresije gena *crypt* (Slika 14). Uspješnost obrnutog prepisivanja mRNA u cDNA provjerena je reakcijom PCR za uobičajeno eksprimirani gen β -aktin. Različita veličina odsječaka gena za β -aktin, dobivena umnažanjem genomske DNA (koja uključuje intron, 412 bp) i cDNA (330 bp), potvrđuje odsutnost kontaminacije uzoraka mRNA genomskom DNA (Slika 14).



Slika 14. Ekspresije gena *crypt* i β -aktin 14 dana nakon indukcije etanolom, određene RT-PCR-om. Transgeno korijenje ukrasne koprive tretirano 1% -tnim (O3, O5 i O6) i 2% -tnim etanolom (linija OA4, O3, O5 i O6). Kontrolno korijenje je tretirano vodom (K). M: standard duljine odsječaka DNA *Direct Load Step Ladder* (50 bp); P: plazmidna DNA; G: genomski DNA; N: negativna kontrola s vodom.

Razina ekspresije gena *crypt* u transgenom korijenju tretiranom 1%-tnim i 2%-tnim etanolom procjenjena je semi-kvantitativnim RT-PCR-om (Slika 15). U istoj reakciji PCR umnoženi su geni *crypt* i β -aktin. Analizom PCR produkata utvrđena je veća razina ekspresije gena *crypt* u tkivu tretiranom 2% -tnim etanolom u odnosu na tkivo tretirano 1%-tnim etanolom, dok u korijenju tretiranom vodom nije došlo do ekspresije gena *crypt*. Intenzitet vrpce normaliziran je prema razini mRNA β -aktina. Kvantifikacija intenziteta vrpce pokazala je povećanu ekspresiju u korijenju tretiranom 2%-tnim etanolom za 71% (linija O3), 96% (linija O5) i za 117% (linija O6) u odnosu na tretman 1%-tnim etanolom (Slika 15). Razina ekspresije β -aktina u liniji OA4 poslužila je kao dodatna kontrola koja je pokazala kako tretman tkiva transgenog korijenja etanolom nije imao nikakav utjecaj na ekspresiju β -aktina, osim toga podjednaka razina ekspresije ovog gena u liniji OA4 u odnosu na ostale linije tretirane etanolom pokazuje kako tijekom reakcije PCR ne dolazi do kompeticije između umnažanja cDNA transkripta gena *crypt* i β -aktina.



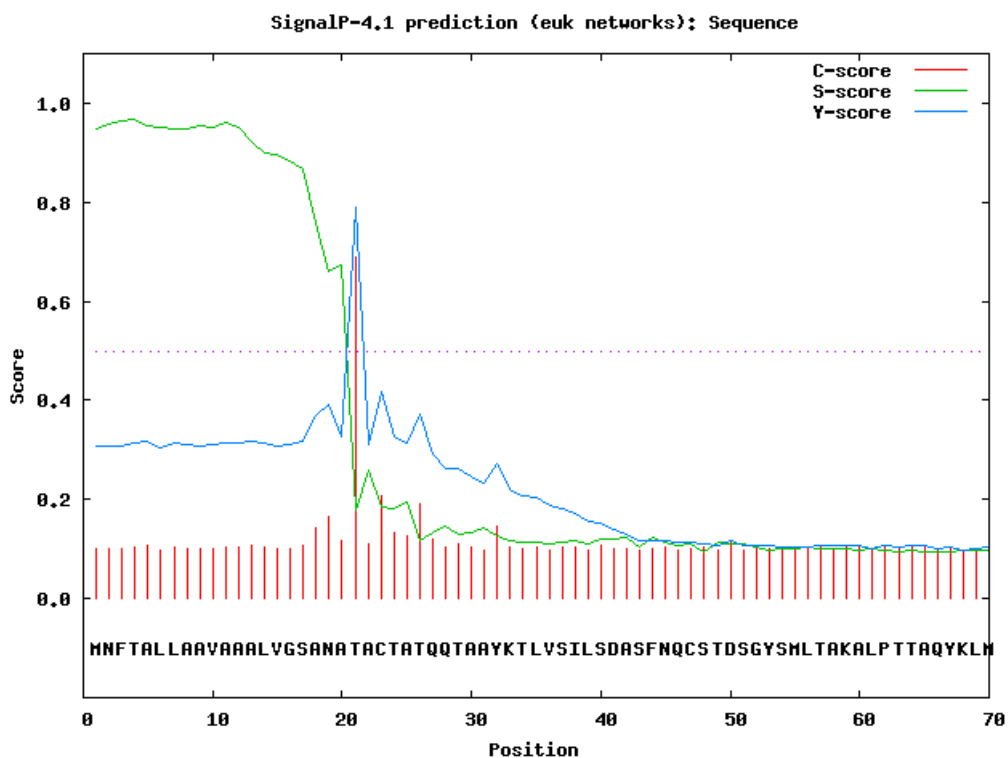
Slika 15. Razina ekspresije gena *crypt* i β -aktin 14 dana nakon indukcije etanolom procjenjena semi-kvantitativnim RT-PCR-om. Transgeno korijenje ukrasne koprive tretirano 1% -tnim (O3, O5 i O6) i 2% -tnim etanolom (linija OA4, O3, O5 i O6). Kontrolno korijenje je tretirano vodom (K). M: standard duljine odsječaka DNA *Direct Load Step Ladder* (50 bp). Intenzitet vrpce kvantificiran je softverom *Kodak 1-D image analysis* (Eastman Kodak, New Haven, SAD) i normaliziran prema odgovarajućem signalu β -aktina.

4.5. Bioinformatičko predviđanje stanične lokalizacije β -kriptogeina

Vjerojatnost stanične lokalizacije β -kriptogeina predviđena je različitim bioinformatičkim programima (Yloc, TargetP 1.1, WOLF PSORT i MultiLoc), koji su analiziranjem aminokiselinskog slijeda β -kriptogeina dali vrlo slične rezultate (Tablica 5). Prema rezultatima analize, endogeno sintetiziran β -kriptogein secernira se van stanice, odnosno dobiveni rezultati ukazuju na izvanstaničnu lokalizaciju β -kriptogeina. SignalP 4.1 serverom određena je prisutnost N-terminalnog signalnog peptida s mjestom za cijepanje između 20. i 21. aminokiselinskog ostatka (Slika 16).

Tablica 5. Bioinformatičko predviđanje stanične lokalizacije β -kriptogaina u biljnim stanicama.

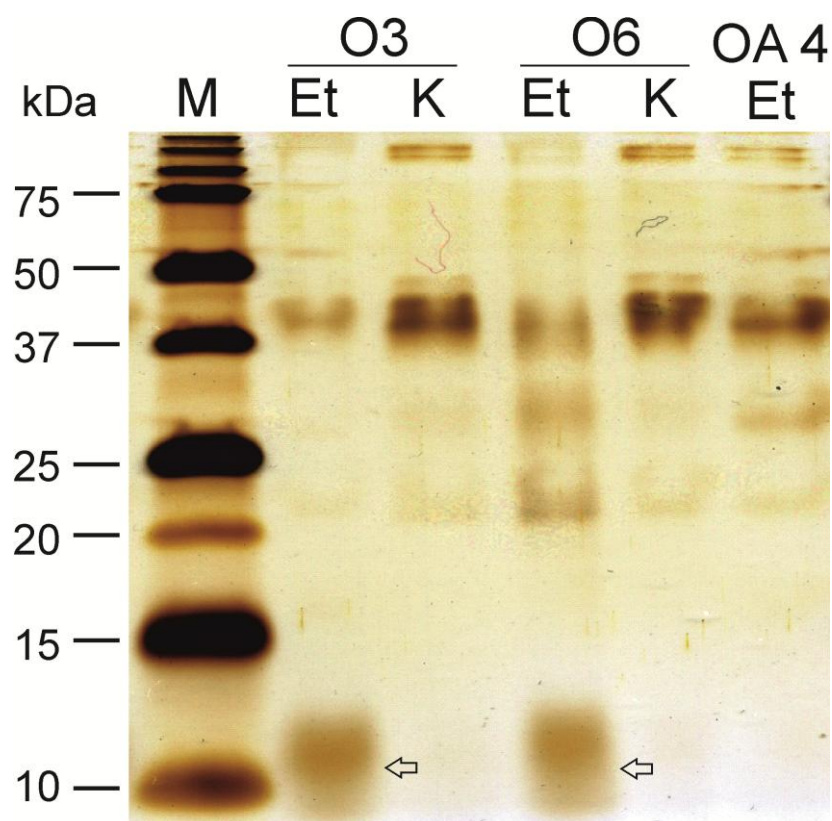
| Softver | Rezultati predviđanja/vjerojatnost |
|-------------------|--|
| YLoc | sekrecija 100% |
| TargetP | sekrecija 82% |
| WOLF PSORT | kloroplasti 6, izvanstanični 5, jezgra 1, citoplazma 1 |
| MultiLoc (biljke) | izvanstanični 63%, ^a kloroplasti 12%, citoplazma 7% |



Slika 16. Prisutnost N-terminalnog signalnog peptida kod β -kriptogaina s mjestom za cijepanje između 20. i 21. aminokiselinskog ostatka određena SignalP 4.1 serverom.

4.6. Izvanstanični proteini u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja

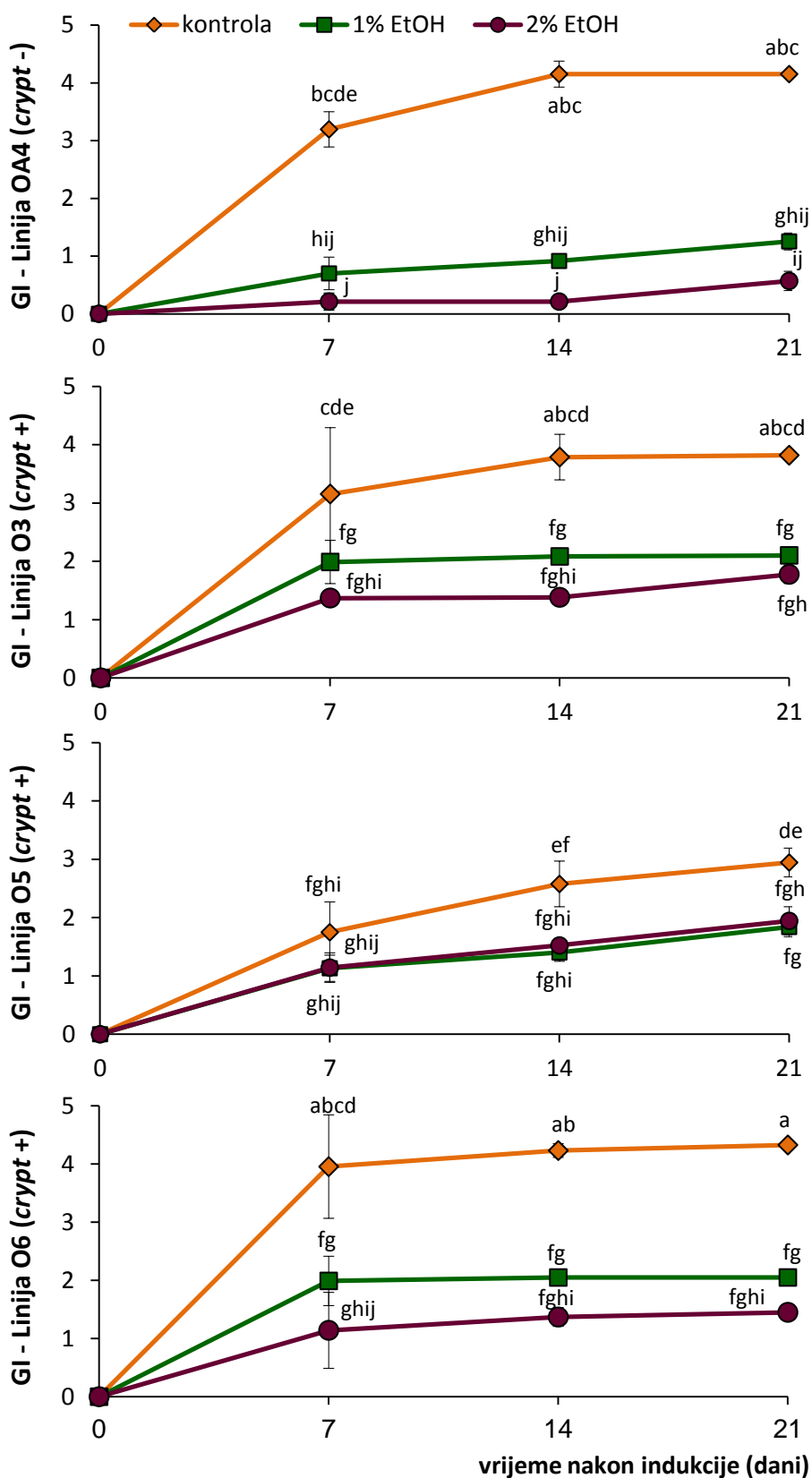
Zbog nedostatka protutijela za β -kriptogein elektroforezom SDS-PAGE analizirani su izvanstanični proteini. Analizirane su tekuće hranjive podloge u kojima je uzgajano transgeno korijenje linija OA4, O3 i O6 tretirano 1%-tnim etanolom ili vodom. Hranjiva je podloga uzorkovana 14 dana nakon tretmana etanolom budući da je tada zabilježena i ekspresija gena *crypt*, te se u skladu s time očekuje i sinteza β -kriptogeina. Hranjiva podloga linije OA4 poslužila je kao kontrola da dobivene proteinske vrpce ne nastaju uslijed ekspresije gena i sinteze proteina potaknutim etanolom *per se*. Utvrđena je prisutnost specifične proteinske vrpce, čija veličina odgovara molekularnoj masi β -kriptogeina (od otprilike 10 kDa), samo u *crypt*-linijama tretiranim etanolom (Slika 17). Navedena proteinska vrpca nije uočena u uzorku proteina iz tekuće hranjive podloge na kojoj je rasla linija OA4 tretirana etanolom, kao niti u hranjivim podlogama *crypt*-linija tretiranih vodom. Prema rezultatima predviđanja, učinjenim pomoću servera ExPASy (softverskim alatom Compute pI/Mw), molekulska masa β -kriptogeina iznosi 10.4 kDa.



Slika 17. Reprezentativni SDS-PAGE izvanstaničnih proteina u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja ukrasne koprive (linija OA4, O3 i O6) induciranog 1% -tnim etanolom (Et) ili vodom (K). M: standard molekularne mase proteina *Precision Plus Protein*TM Standard. Gel je nakon bojenja srebrovim nitratom dokumentiran skeniranjem pomoću skenera HP ScanJet 3400C (Hewlett-Packard Company, Palo Alto, SAD).

4.7. Učinak ekspresije gena *crypt* na rast transgenog korijenja ukrasne koprive

Linije kosmatog korijenja rasle su u dvije faze, a kako je svrha ovog eksperimenta odrediti i utjecaj β -kriptogeina na rast transgenog korijenja, indeks rasta (GI) korijenja mjereno je tijekom 2. faze rasta nakon indukcije ekspresije gena *crypt*. Povećanje rasta korijenja u sve četiri transgene linije (OA4, O3, O5 i O6) prisutno je do 7. dana od tretmana etanolom (11. dan subkulture), nakon čega sve linije ulaze u stacionarnu fazu rasta budući da se GI korijenja, tijekom naredna dva tjedna, nije značajno mijenjao u odnosu na sedmi dan (Slika 18). Tretman etanolom značajno je smanjio rast transgenog korijenja. Tjedan dana nakon tretmana 1% -tnim i 2% -tnim etanolom GI linije OA4 se smanjio za 78% ($P = 0.00002$) odnosno 93% ($P = 0.000024$) u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom. GI korijenja značajno je manji i u *crypt*-linija (O3 i O6) induciranih etanolom u odnosu na korijenje tretirano vodom, s izuzetkom linije O5 gdje 7. i 14. dan nije bilo značajne razlike između GI korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom (Slika 18). Sedmi dan nakon tretmana 1% -tnim etanolom GI korijenja linije O3 i O6 smanjio se za 37% ($P = 0.033$) i 50% ($P = 0.00002$), dok je tretman 2% -tnim etanolom uzrokovao smanjenje GI korijenja za 57% ($P = 0.0001$) i 71% ($P = 0.00002$). Između tretmana različitim koncentracijama etanola (1% i 2%) nisu uočene statistički značajne razlike. Nakon tri tjedna rasta u kulturi korijenje je zbog nedostatka hranjivih tvari i prostora za rast počelo tamniti i nekrotizirati. Prema rezultatima preliminarnog ekperimenta, u 1. fazi rasta korijenčića prije tretmana etanolom, GI za linije OA4, O3 i O6 iznosio je 4-5, dok je za liniju O5 bio oko 3.

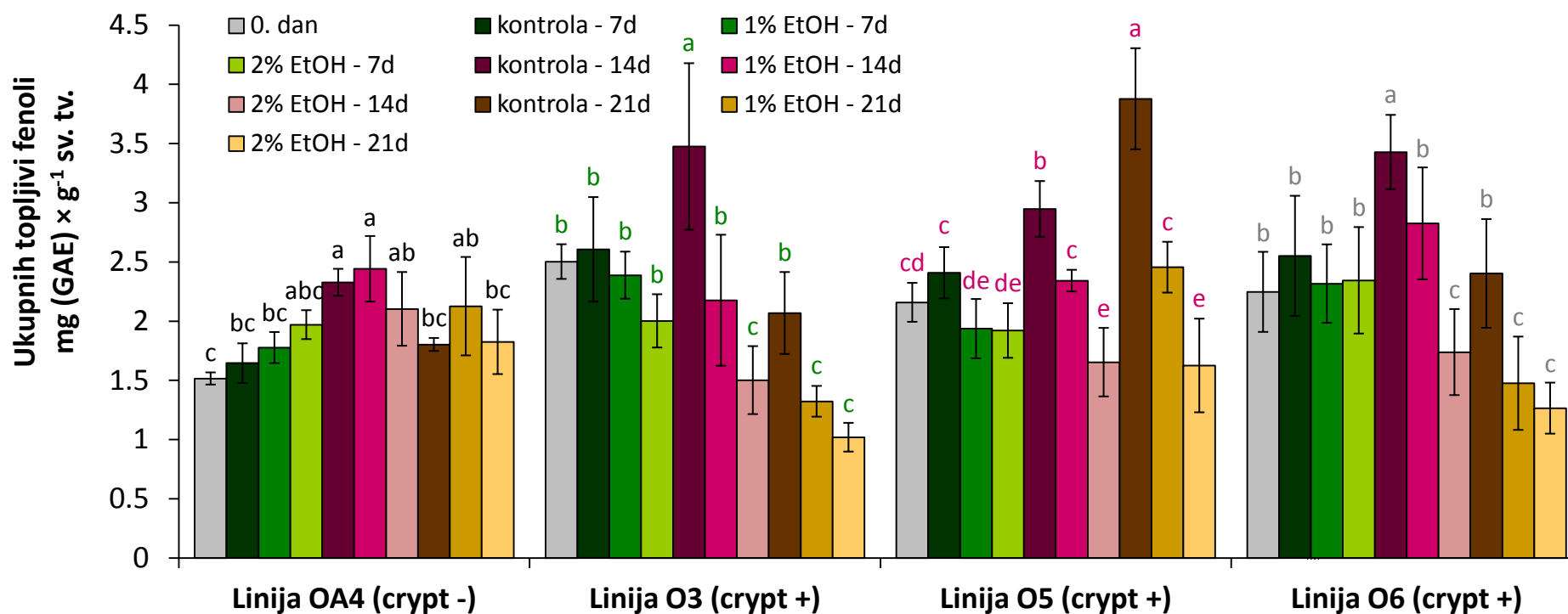


Slika 18. Indeks rasta (GI) transgenog korijenju ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) mjereno tijekom druge faze rasta određivanjem mase svježeg korijenja prije indukcije etanolom te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom

(EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Testiranje razlika između pojedinih skupina Newman-Keuls testom uključuje sve linije i sva uzorkovanja u svim vremenskim intervalima. Slova označavaju statistički značajne razlike ($P < 0.05$).

4.8. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u transgenom korijenju ukrasne koprive

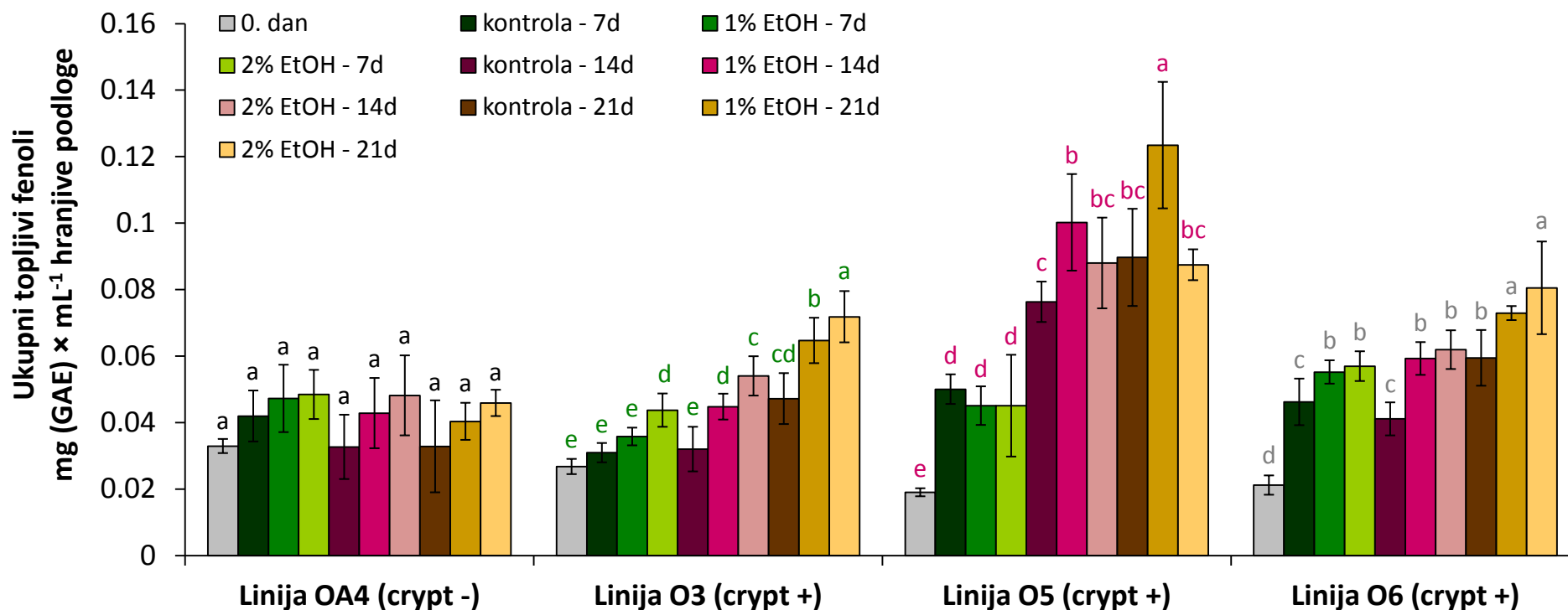
Tijekom rasta praćen je sadržaj ukupnih topljivih fenola u transgenom korijenju (Slika 19). Najveći sadržaj ukupnih fenola u svih linija izmjeren je u stacionarnoj fazi rasta, a to je 14. dan subkulture za linije OA4, O3 i O6 te 21. dan subkulture za liniju O5. Tretman etanolom nije imao učinak na akumulaciju ukupnih topljivih fenola u korijenju linije OA4 no značajno je utjecao na akumulaciju fenolnih spojeva u transgenim *crypt* linijama. U kontrolnoj liniji OA4, bez gena *crypt* tijekom indukcijskog perioda, nije uočena značajna razlika u sadržaju ukupnih topljivih fenola između korijenja tretiranog etanolom (1% i 2%) i korijenja tretiranog vodom. Fenolni spojevi u svim *crypt*-linijama (O3, O5 i O6) akumuliraju se po vrlo sličnom obrascu. Tjedan dana nakon indukcije tkiva etanolom nisu uočene značajne razlike u sadržaju ukupnih topljivih fenola između korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom, osim u linije O5 gdje je sadržaj fenola značajno manji u tkivu tretiranom 1% -tnim ($P = 0.018$) i 2% -tnim etanolom ($P = 0.021$) u odnosu na kontrolu. Dva tjedna nakon indukcije *crypt*-linija etanolom, sadržaj ukupnih topljivih fenola u korijenju smanjuje se ovisno o koncentraciji primijenjenog etanola. Nakon tretmana 1% -tnim etanolom sadržaj fenola u tkivu smanjuje se za 18-37% ($P < 0.005$), dok se nakon tretmana 2% -tnim etanolom sadržaj fenola smanjuje za 44-57% ($P = 0.0001$) u odnosu na kontrolno korijenje. Treći tjedan nakon tretmana etanolom sadržaj fenola u tkivu *crypt*-linija nastavio se smanjivati, od 36% do 58% u odnosu na kontrolno tkivo ($P < 0.01$). U linija O3 i O6 nije uočena značajna razlika u sadržaju fenola u tkivu tretiranom različitim koncentracijama etanola, dok je u linije O5 smanjenje sadržaja fenola značajno ovisilo o koncentraciji etanola ($P = 0.0001$). Dakle može se zaključiti da je ekspresija gena *crypt* u transgenom korijenju linija O3, O5 i O6 povezana sa smanjenjem sadržaja fenola u tkivu korijena.



Slika 19. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) prije indukcije ekspresije gena *crypt* te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između pojedinih mjerenja testirane su unutar svake linije posebno Newman-Keuls testom. Zasebno su statistički obrađeni podaci za pojedinu liniju, a slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.9. Izlučivanje fenolnih spojeva iz tkiva u hranjivu podlogu transgenog korijenja

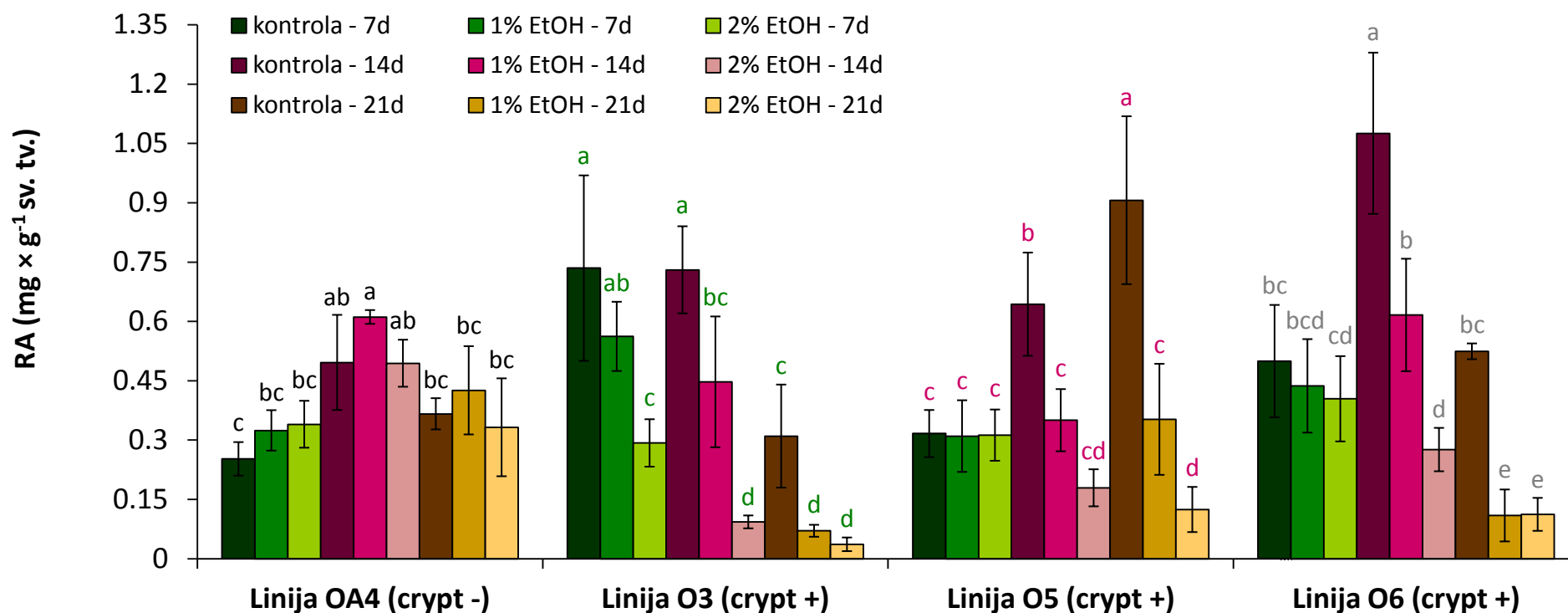
S obzirom na značajno smanjenje količine fenolnih spojeva u tkivu transgenih *crypt*-linija analizirana je hranjiva podloga u kojoj je tkivo uzgajano. Izlučivanje fenolnih spojeva u tekuću hranjivu podlogu praćeno je tijekom rasta i uslijed indukcije korijenja etanolom (Slika 20). Tretman etanolom nije imao učinak na sekreciju fenolnih spojeva iz korijenja OA4 u tekuću hranjivu podlogu; tijekom indukcijskog perioda, nije uočena značajna razlika u sadržaju ukupnih topljivih fenola u hranjivoj podlozi korijenja tretiranog etanolom (1% i 2%) i korijenja tretiranog vodom. Sadržaj fenolnih spojeva u hranjivoj podlozi *crypt*-linija (O3, O5 i O6) induciranih etanolom rastao je tijekom trotjednog indukcijskog perioda. Značajan porast sadržaja ukupnih topljivih fenola u tekućoj hranjivoj podlozi, u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom, uočen je tjedan dana nakon indukcije 2% -tnim etanolom u linije O3 ($P = 0.002$) te u linije O6 tretirane s obje koncentracije etanola (1%, $P = 0.039$; 2%, $P = 0.038$). Sekrecija fenolnih spojeva inducirana etanolom nastavila se tijekom indukcijskog perioda. Povećanje sekrecije fenola u linije O3 ovisilo je o koncentraciji primijenjenog etanola. Dva tjedna nakon indukcije tkiva etanolom (1% i 2%) sadržaj ukupnih topljivih fenola je u hranjivoj podlozi linije O3 povećan za 40% ($P = 0.0025$) odnosno za 69% ($P = 0.0001$), dok je nakon tri tjedna povećan za 37% ($P = 0.00013$), odnosno za 52% ($P = 0.00016$). Objе koncentracije etanola stimulirale su sekreciju fenola u linije O6, nakon dva tjedna indukcije za 44-50% (1%, $P = 0.0009$; 2%, $P = 0.0003$), a nakon tri tjedna za 23-35% (1%, $P = 0.0074$; 2%, $P = 0.0002$). Sekreciju fenola u linije O5 stimulirala je samo indukcija s 1% -tnim etanolom. Dva tjedna nakon tretmana etanolom, sadržaj fenola u hranjivoj podlozi linije O5 porastao je za 31% ($P = 0.023$), dok je nakon tri tjedna porastao za 38% ($P = 0.00025$) u odnosu na kontrolno korijenje, kada je zabilježena i najveći sadržaj ukupnih topljivih fenola u tekućoj podlozi ($0.123 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$). Maksimum sekrecije, u odnosu na kontrolno korijenje, u linije O3 i O6 postignut je dva tjedna nakon tretmana 2% -tnim etanolom, dok je u linije O5 maksimum sekrecije postignut tri tjedna nakon indukcije 1% -tnim etanolom. Maksimalna sekrecija fenolnih spojeva (69%), u odnosu na kontrolu tretiranu vodom, utvrđena je u linije O3. Iz navedenih rezultata može se zaključiti da je indukcija gena *crypt* etanolom u transgenom korijenju povezana s povećanim sadržajem ukupnih topljivih fenola u hranjivoj podlozi, odnosno sa stimulacijom sekrecije fenolnih spojeva.



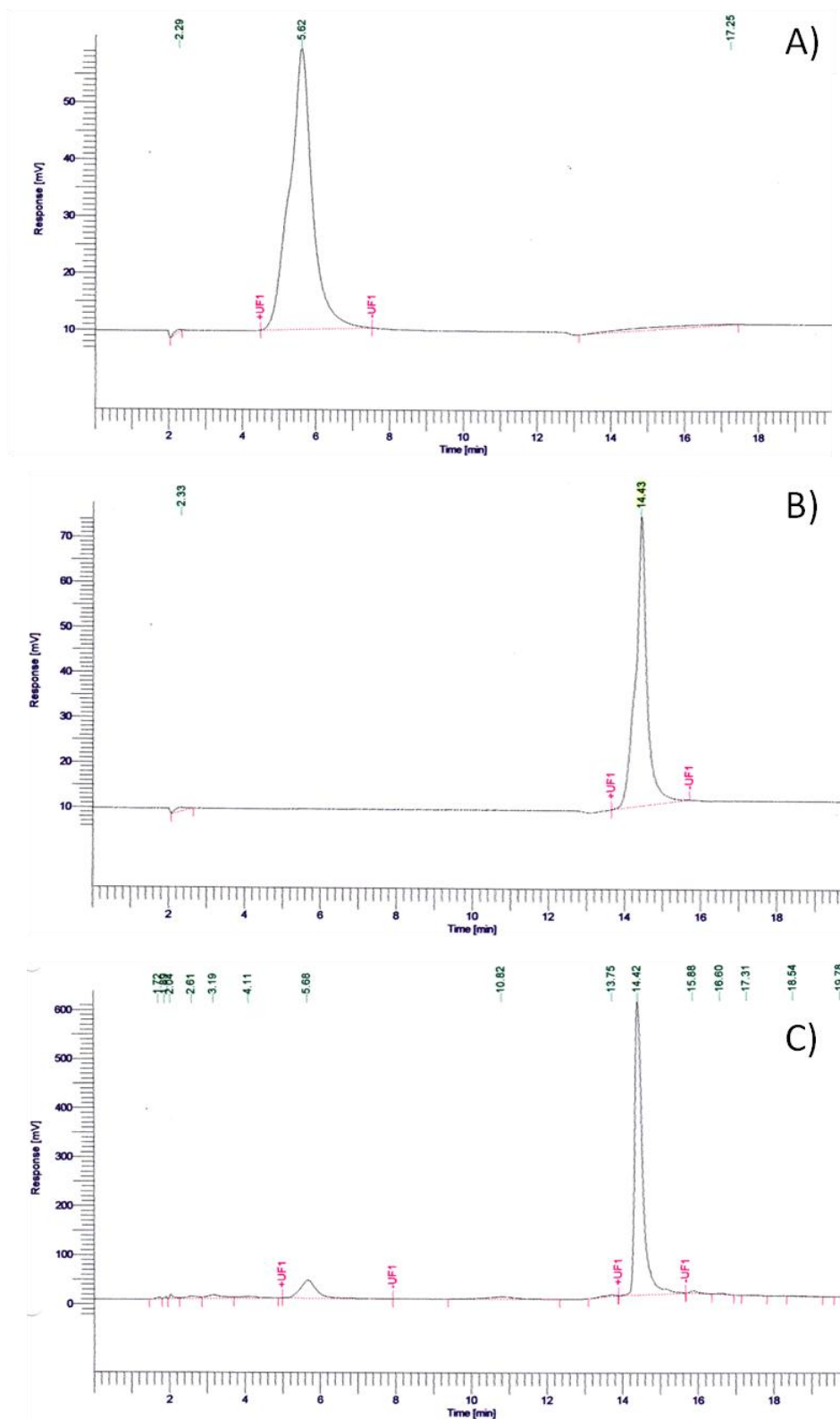
Slika 20. Sadržaj ukupnih topljivih fenola u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) prije indukcije ekspresije gena *crypt* te 7., 14. i 21. dan nakon indukcije 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Razlike između pojedinih mjerenja testirane su unutar svake linije posebno Newman-Keuls testom. Zasebno su statistički obrađeni podaci za pojedinu liniju, a slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.10. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive

Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju tretiranom etanolom analiziran je HPLC-om i prikazan na Slici 21. RA je identificirana usporedbom vremena retencije i UV-spektra s referentnim standardom ružmarinske kiseline (Slika 22B, C), dok je sadržaj određen pomoću standardne krivulje ovisnosti površine pika i različitih koncentracija standarda. Prema rezultatima HPLC analize sadržaj RA u transgenom korijenju značajno je narastao ulaskom tkiva u stacionarnu fazu rasta, osim za liniju O3 koja i tijekom eksponencijalne faze rasta nakuplja maksimalni sadržaj RA. Tretman etanolom nije imao učinak na akumulaciju RA u korijenju linije OA4; tijekom indukcijskog perioda nije uočena značajna razlika u sadržaju RA između korijenja tretiranog etanolom (1% i 2%) i korijenja tretiranog vodom. Kao što je bio slučaj kod sadržaja fenola u tkivu, ekspresija gena *crypt* u transgenom korijenju induciranom etanolom povezana je i sa smanjenjem razine RA u tkivu. Smanjenje sadržaja RA u *crypt*-linijama ovisilo je o konačnoj koncentraciji primijenjenog etanola. Tjedan dana nakon indukcije tkiva etanolom nisu uočene značajne razlike u sadržaju RA u tkivu korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom, osim u linije O3 gdje je sadržaj RA, u odnosu na kontrolno tkivo, značajno manji u tkivu tretiranom 2% -tnim etanolom ($P = 0.00025$). Dva tjedna nakon tretmana 1% -tnim etanolom sadržaj RA u tkivu linije O3 smanjuje se za 39% ($P = 0.0061$), u linije O5 za 46% ($P = 0.0003$) te u linije O6 za 43% ($P = 0.0001$) u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom. Nakon tretmana 2% -tnim etanolom sadržaj RA smanjuje se za 87% (linija O3, $P = 0.00014$), 72% (linija O5, $P = 0.00014$) i za 74% (linija O6, $P = 0.00014$) u odnosu na kontrolno korijenje. Treći tjedan nakon tretmana etanolom sadržaj RA u tkivu *crypt*-linija nastavio se smanjivati, u linije O3 za 77-88% (1%, $P = 0.04$; 2%, $P = 0.023$), a u linije O6 za 79% ($P = 0.00014$). U linija O3 i O6 nije uočena značajna razlika u sadržaju RA između tretmana različitim koncentracijama etanola, dok je u linije O5 smanjenje sadržaja RA značajno ovisilo o konačnoj koncentraciji etanola u podlozi. Sadržaj RA u tkivu linije O5 induciranom 1% -tnim etanolom smanjen je za 61% ($P = 0.00013$), dok je tretman 2% -tnim etanolom uzrokovao smanjenje za 86% ($P = 0.00013$) u odnosu na kontrolno korijenje. Dakle može se zaključiti da je ekspresija gena *crypt* u transgenom korijenju povezana sa smanjenjem sadržaja RA u tkivu korijena.



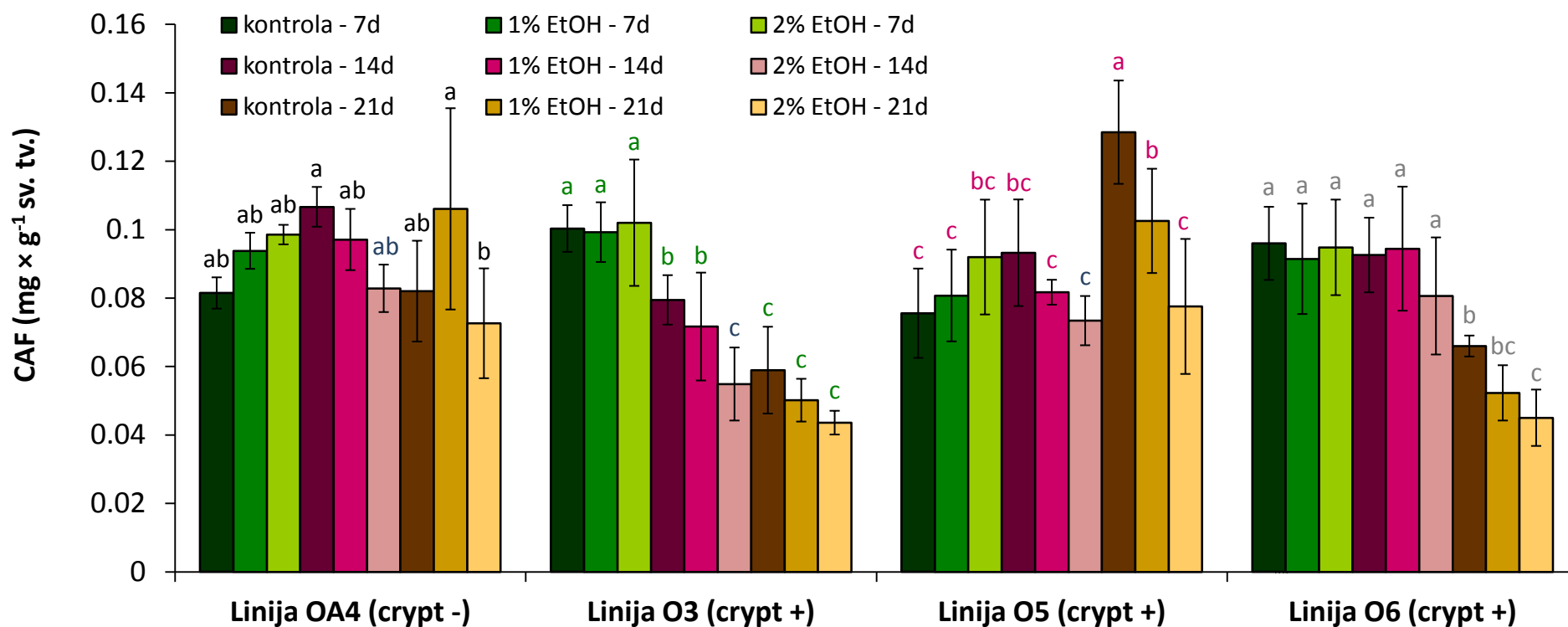
Slika 21. Sadržaj ružmarinske kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati ($n = 9$) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između pojedinih mjerenja testirane su unutar svake linije posebno Newman-Keuls testom. Zasebno su statistički obrađeni podaci za pojedinu liniju, a slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije ($P < 0.05$).



Slika 22. Razdvajanje fenolnih kiselina kromatografijom HPLC. A) Kromatogram standarda kavene kiseline ($0.015 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$); B) kromatogram standarda ružmarinske kiseline ($0.025 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$); C) kromatogram metanolnog ekstrakta tkiva transgenog korijena ukrasne koprive (linija O3).

4.11. Sadržaj kavene kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive

Sadržaj kavene kiseline u transgenom korijenju induciranom etanolom analiziran je HPLC-om i prikazan na Slici 23. CAF je identificirana usporedbom vremena retencije i UV-spektra s referentnim standardom kavene kiseline (Slika 22A, C), dok je sadržaj određen pomoću standardne krivulje ovisnosti površine pika i različitih koncentracija standarda. Prema rezultatima HPLC analize, tretman etanolom nije imao učinak na akumulaciju CAF u korijenju linije OA4; tijekom induksijskog perioda, nije uočena značajna razlika u sadržaju CAF između korijenja tretiranog etanolom (1% i 2%) i korijenja tretiranog vodom. Sadržaj CAF u tkivu crypt-linija induciranih etanolom bio je prilično stabilan tijekom rasta no smanjivao se u stacionarnoj fazi rasta. Značajno niži sadržaj CAF, u odnosu na kontrolu, uočen je tri tjedna nakon indukcije linije O5 1% -tnim ($P = 0.0017$) i 2% -tnim ($P = 0.00013$) etanolom te u linije O6 tretirane 2% -tnim etanolom ($P = 0.013$). Također, u linije O3, 14. dan nakon tretmana 2% -tnim etanolom uočen je značajno manji sadržaj CAF u odnosu na kontrolno korijenje ($P = 0.0012$).



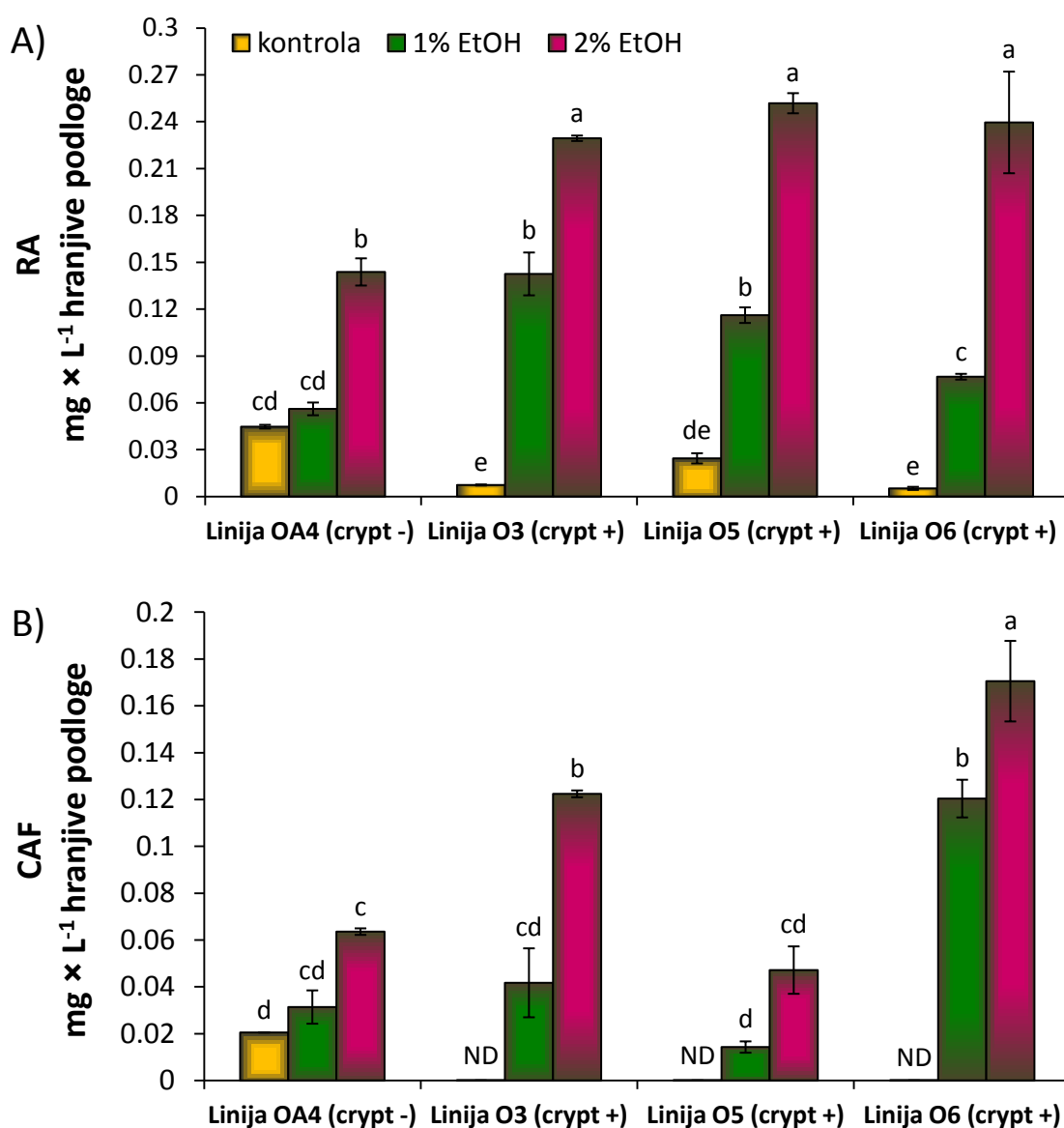
Slika 23. Sadržaj kavene kiseline u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) 7., 14. i 21. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -nim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti \pm SD. Razlike između pojedinih skupina testirane su unutar svake linije posebno Newman-Keuls testom. Zasebno su statistički obrađeni podaci za pojedinu liniju, a slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije ($P < 0.05$).

4.12. Sadržaj ružmarinske i kavene kiseline u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja ukrasne koprive

Dva tjedna nakon indukcije ekspresije gena *crypt* u transgenom korijenju etanolom određivan je sadržaj ružmarinske i kavene kiseline u tekućoj hranjivoj podlozi, budući da je u preliminarnom eksperimentu pokazano kako tada dolazi do povećane sekrecije ukupnih topljivih fenola u hranjivu podlogu. Sadržaj RA i CAF u tekućoj hranjivoj podlozi HPLC analizom je prikazan na Slici 24. Tretman transgenog korijenja linije OA4 1% -tnim etanolom nije imao učinak na sekreciju RA u tekuću hranjivu podlogu, dok je tretman 2% -tnim etanolom 3 puta povećao sadržaj RA u tekućoj podlozi u odnosu na kontrolu ($P = 0.00016$, Slika 24A). HPLC analiza pokazala je znatno veći sadržaj RA u hranjivim podlogama *crypt*-linija tretiranih etanolom u odnosu na podlogu kontrolnog korijenja tretiranog vodom ($P < 0.05$). Sekrecija RA ovisila je o konačnoj koncentraciji etanola u podlozi te je bila najveća u korijenja inducirano 2% -tnim etanolom (Slika 24A). Sadržaj RA u hranjivoj podlozi transgenog korijenja tretiranog 1% -tnim etanolom povećan je, u odnosu na kontrolu, 19 puta u linije O3 ($P = 0.00016$), 5 puta u linije O5 ($P = 0.00016$) te 15 puta u linije O6 ($P = 0.0005$). Tretman transgenog korijenja 2% -tnim etanolom povećao je sadržaj RA u hranjivoj podlozi, u odnosu na kontrolu, 31 puta u linije O3 ($P = 0.00018$), 10 puta u linije O5 ($P = 0.00019$) te 46 puta u linije O6 ($P = 0.00022$).

Tretman transgenog korijenja linije OA4 1% -tnim etanolom nije imao učinak na sekreciju CAF u tekuću hranjivu podlogu, dok je tretman 2% -tnim etanolom 3 puta povećao sadržaj CAF u tekućoj hranjivoj podlozi u odnosu na kontrolu ($P = 0.013$, Slika 24B). CAF nije zabilježena u hranjivoj podlozi *crypt*-linija tretiranih vodom, dok je zabilježena u hranjivoj podlozi korijenja tretiranog etanolom. Sekrecija CAF ovisila je o konačnoj koncentraciji etanola u podlozi te je bila veća u korijenja tretiranog 2% -tnim etanolom (Slika 24B). Sadržaj CAF u hranjivoj podlozi transgenog korijenja tretiranog 2% -tnim etanolom bio je značajno povećan, u odnosu na tretman 1% -tnim etanolom, u linije O3 ($P = 0.00019$) i u linije O6 ($P = 0.0016$), dok u linije O5 razlika u koncentraciji etnola nije prouzročila statistički značajnu razliku u koncentraciji CAF u podlozi.

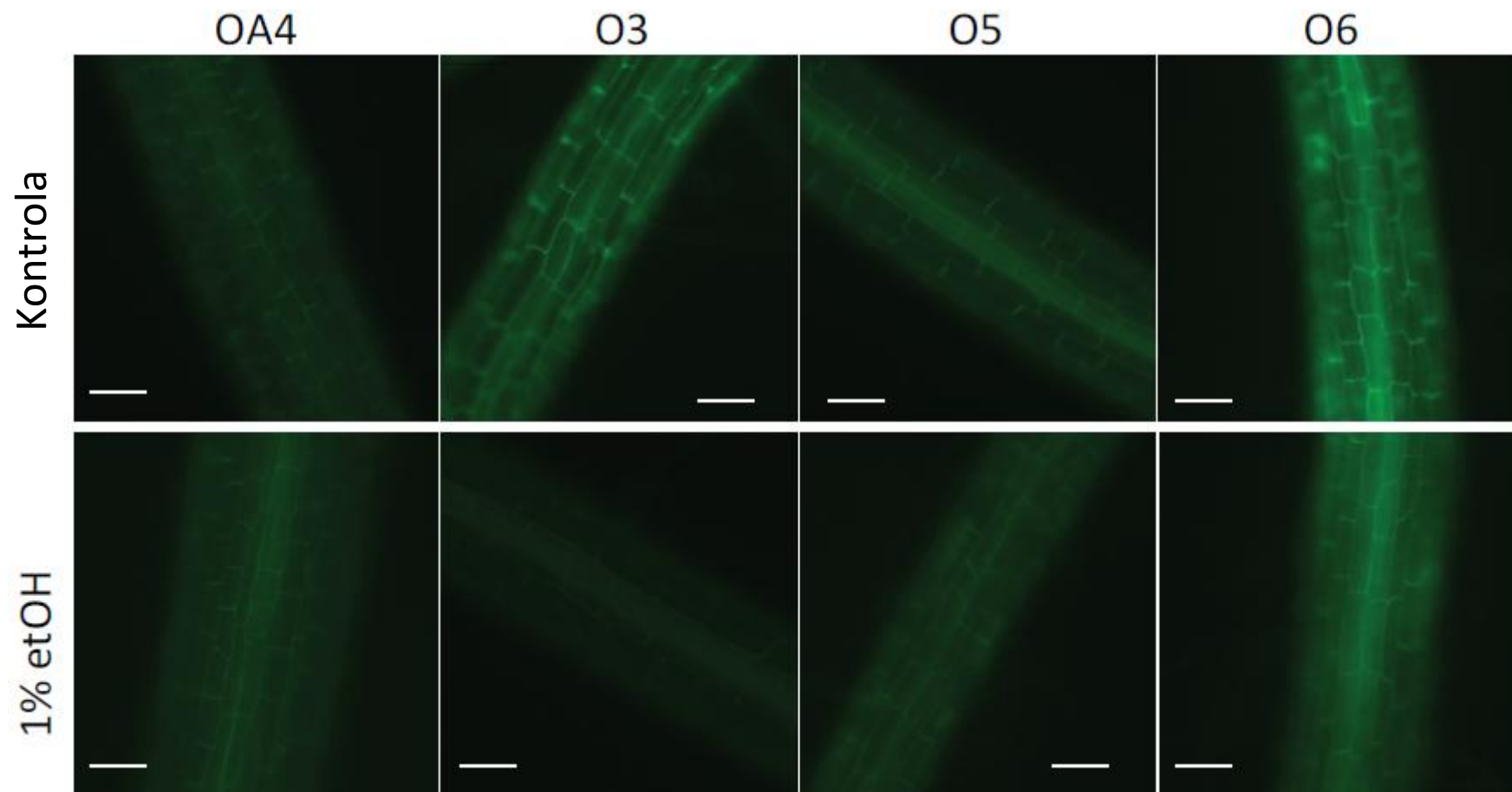
Sekrecija RA ($P = 0.0002$) i CAF ($P < 0.0005$) u *crypt*-linijama induciranim 2% -tnim etanolom bila je značajno veća, u odnosu na liniju OA4.



Slika 24. Sadržaj ružmarinske (RA; A) i kavene (CAF; B) kiseline u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog korijenja ukrasne koprive (linija OA4, O3, O5 i O6) 14 dana nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 1% i 2% -tnim etanolom. Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom. Rezultati (n = 6) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Testiranje razlika između pojedinih skupina Newman-Keuls testom uključuje sve linije. Slova označavaju statistički značajne razlike (P < 0.05). ND: nije detektirano.

4.13. Autofluorescencija fenolnih spojeva *in vivo*

Autofluorescencija fenolnih spojeva *in vivo*, u svježem korijenju tretiranom etanolom i vodom (kontrola), promatrana je fluorescentnim mikroskopom (Slika 25). Fenolni spojevi u tkivu korijenja pri pobudnoj svjetlosti valne duljine 450-490 nm fluoresciraju intenzivno žuto-zeleno (515 i 565 nm). Na Slici 25. prikazana je autofluorescencija fenolnih spojeva u transgenom korijenju četiri transgene linije (OA4, O3, O5 i O6) tretirane 1% -tnim etanolom i vodom (kontrolno korijenje). Intenzitet fluorescencije u korijenja linije OA4 tretiranog etanolom i netretiranog korijenja približno je jednak, što upućuje na jednaku akumulaciju fenolnih spojeva. Za razliku od linije OA4, intenzitet autofluorescencije u *crypt*-linija (O3, O5 i O6) tretiranih etanolom manji je u odnosu na intenzitet u kontrolnog korijenja tretiranog vodom. Dobiveni rezultati autofluorescencije korijenja potvrđuju da uslijed ekspresije gena *crypt* dolazi do sekrecije fenolnih metabolita iz tkiva.



Slika 25. Autofluorescencija fenolnih spojeva *in vivo* u svježem transgenom korijenju četiri transgene linije (OA4, O3, O5 i O6) tretirane 1% -tnim etanolom i vodom (kontrola). Skala iznosi 100 μ m.

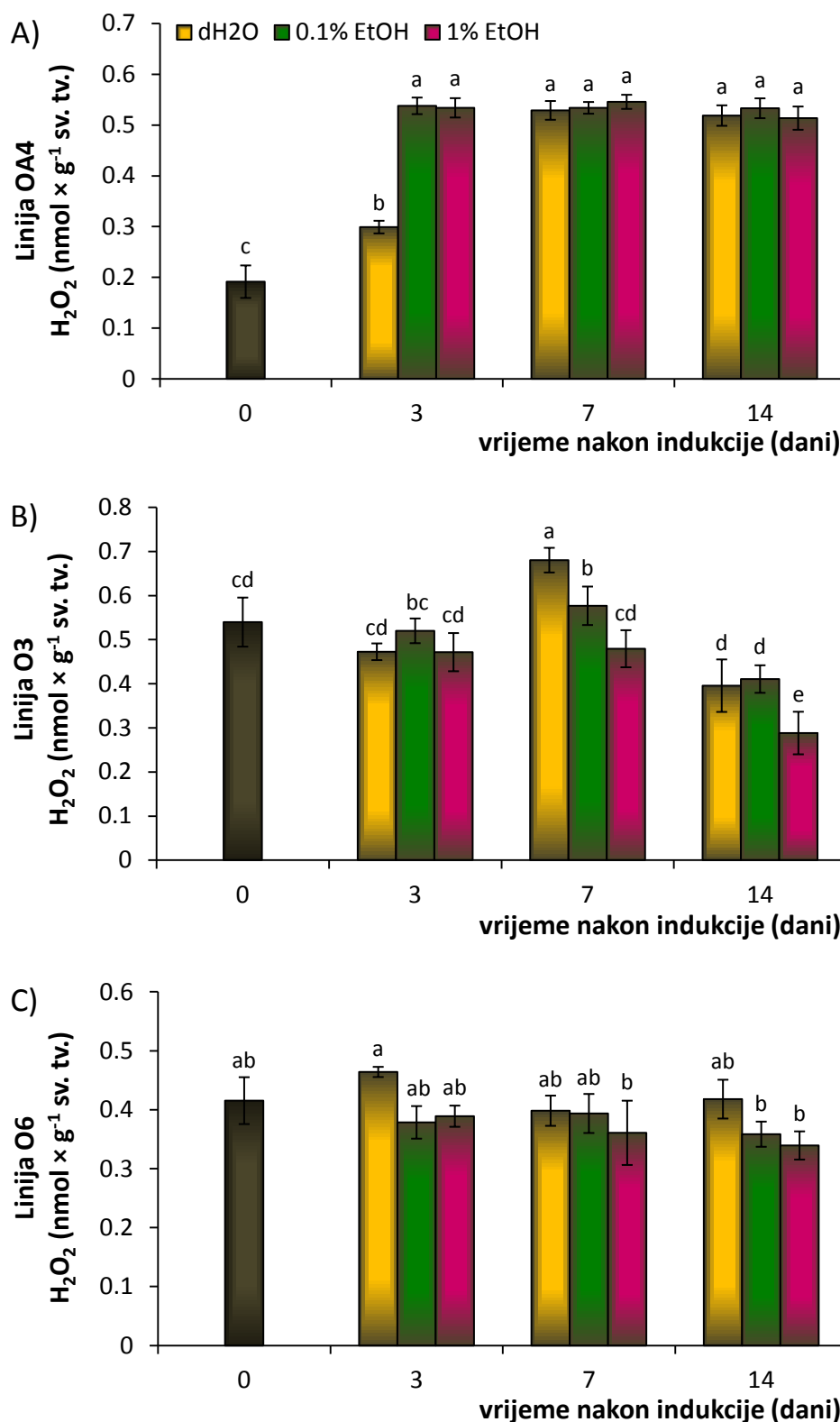
4.14. Oksidacijski/antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive

4.14.1. Količina vodikovog peroksida u transgenom korijenju ukrasne koprive

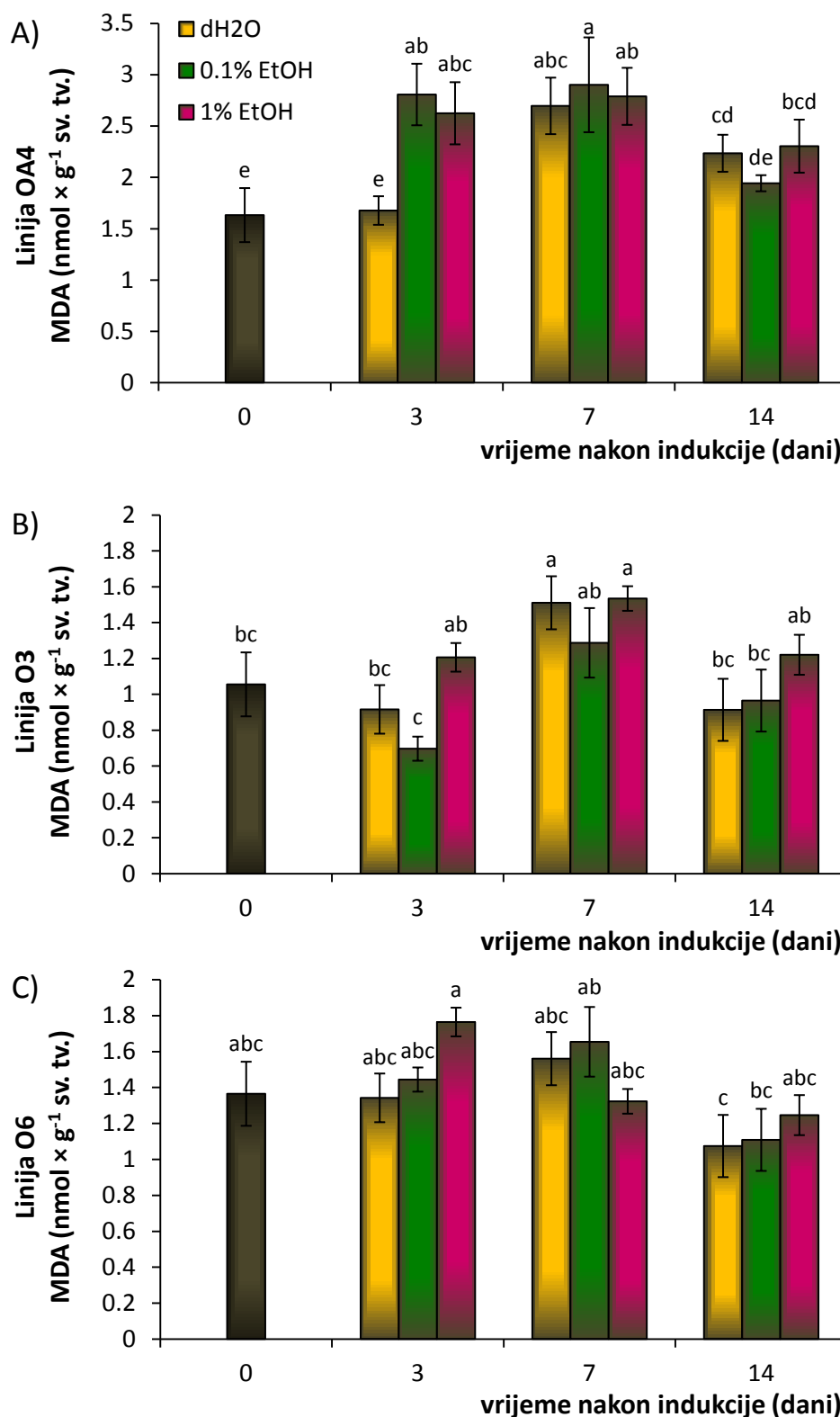
Oksidacijski status transgenog korijenja u kojem je ekspresija gena *crypt* inducirana etanolom procjenjivan je mjerenjem količine H_2O_2 , koja je prikazana na Slici 26. Tri dana nakon tretmana etanolom (0.1% i 1%) u transgenom korijenju kontrolne linije OA4 uočen je značajni porast količine H_2O_2 u odnosu na korijenje iste linije tretirano vodom ($P = 0.00013$), dok je 7. i 14. dan nakon tretmana razina H_2O_2 u tkivu tretiranom vodom dostigla vrijednosti H_2O_2 u etanolom tretiranom tkivu, bez međusobnih značajnih razlika. Za razliku od linije OA4, tri dana nakon tretmana *crypt*-linija nije uočena značajna razlika u količinama H_2O_2 između tkiva tretiranog etanolom i kontrolnog tkiva tretiranog vodom. Tjedan dana nakon tretmana količina H_2O_2 u tretiranom korijenju linije O3 opada ovisno o koncentraciji etanola u tekućoj podlozi, dok količina H_2O_2 u tkivu linije O6 ostaje nepromjenjena. Tretman linije O3 0.1%-tnim etanolom smanjuje količinu H_2O_2 za 15% ($P = 0.004$), dok 1% -tnim etanolom uzrokuje smanjenje količine H_2O_2 za 30% ($P = 0.00013$), u odnosu na korijenje tretirano vodom. Dva tjedna nakon tretmana količina H_2O_2 u korijenju linije O6 i dalje ostaje nepromijenjena, dok u korijenju linije O3 tretiranog 1%-tnim etanolom količina H_2O_2 opada za 27% ($P = 0.003$).

4.14.2. Razina lipidne peroksidacije u transgenom korijenju ukrasne koprive

Oksidacijski status, između ostalog, procjenjuje se i određivanjem razine LPO tkiva. Razina lipidne peroksidacije u transgenom korijenju induciranom etanolom praćena je mjerenjem količine MDA (Slika 27). Tri dana nakon tretmana etanolom (0.1% i 1%) u transgenom korijenju linije OA4 uočen je značajni porast količine MDA u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom ($P \leq 0.0002$), dok se 7. i 14. dan nakon tretmana količina MDA u tkivu tretiranom etanolom nije značajno razlikovala od količine u kontrolnom tkivu. U obje ispitivane *crypt*-linije (O3 i O6) 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom nisu uočene statistički značajne razlike u količini MDA između korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom. U transgenom tkivu razina lipidne peroksidacije ostaje nepromjenjena nakon indukcije ekspresije gena *crypt* etanolom.



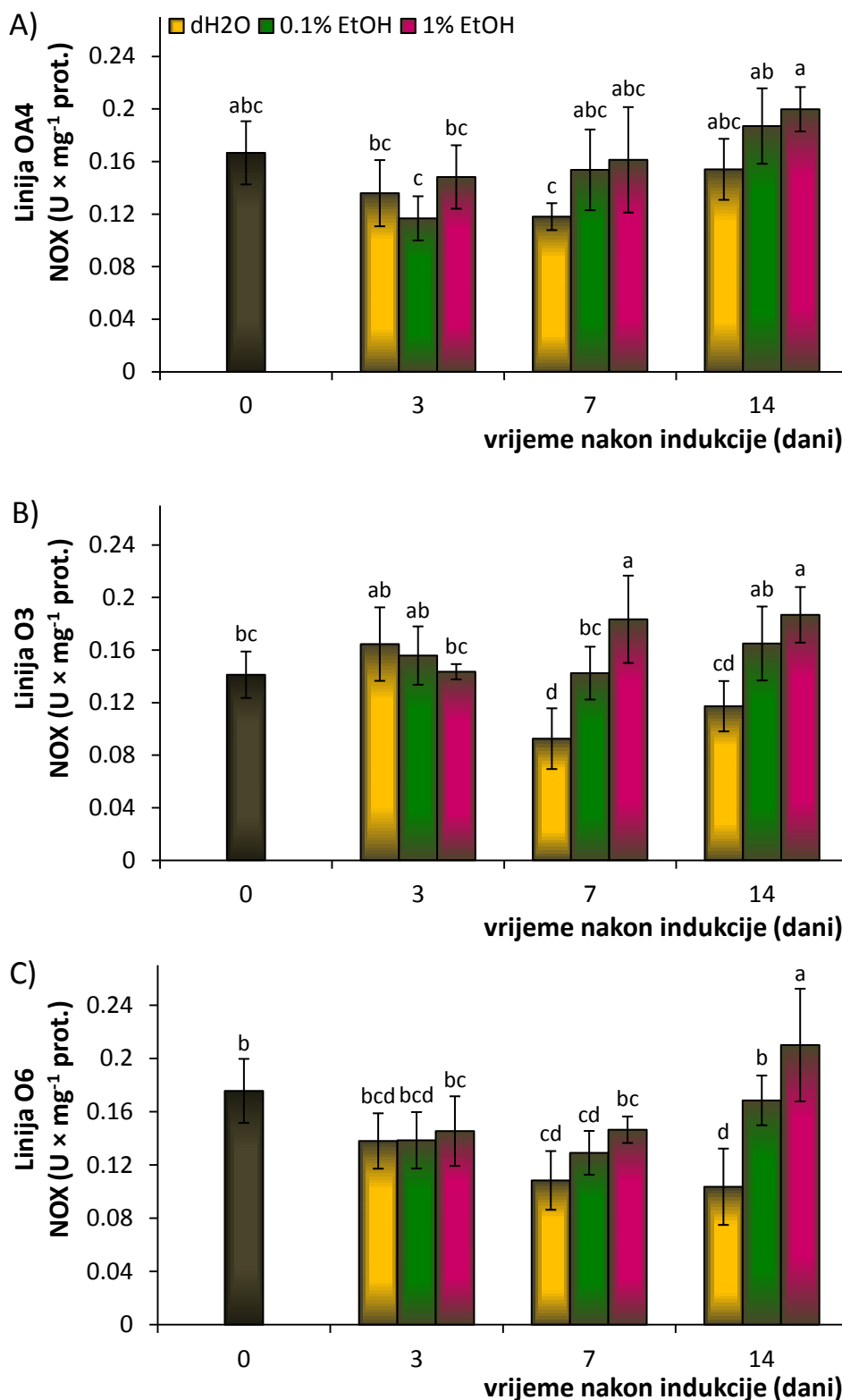
Slika 26. Količina H₂O₂ u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1% -tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).



Slika 27. Količina MDA u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje tretirano vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.14.3. Aktivnost NADPH-oksidge u transgenom korijenu ukrasne koprive

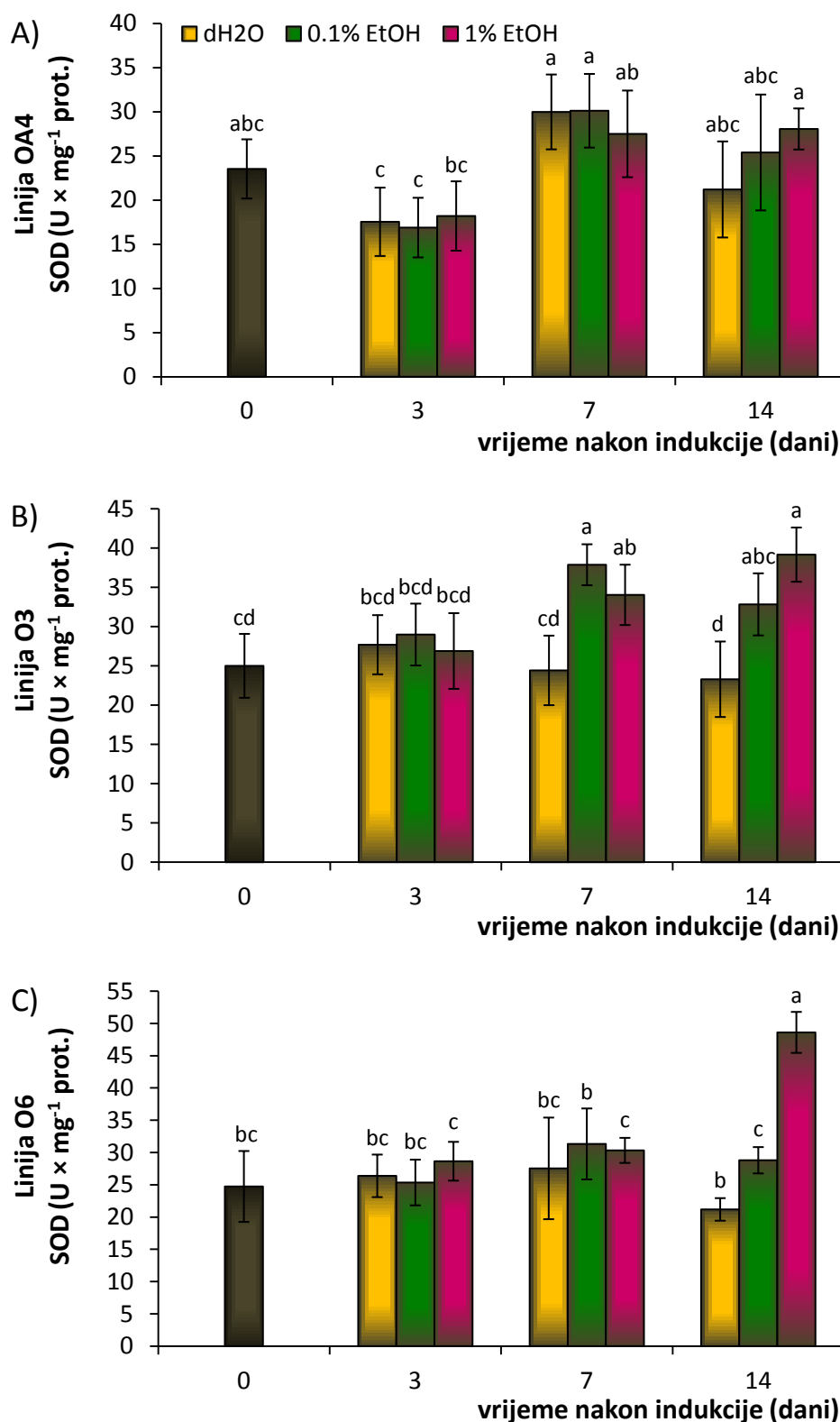
Specifična aktivnost NOX u tkivu transgenog korijenja induciranog etanolom prikazana je na Slici 28. Tretman etanolom nije imao učinak na specifičnu aktivnost NOX u korijenu linije OA4. Tijekom indukcijskog perioda, nije uočena značajna razlika u specifičnoj aktivnosti NOX u tkivu korijenja tretiranog etanolom (0.1% i 1%) i tkivu korijenja tretiranog vodom. Treći dan nakon tretmana etanolom u obje *crypt*-linije (O3 i O6) nisu uočene značajne razlike u specifičnoj aktivnosti NOX u tkivu korijenja tretiranog etanolom i tkivu kontrolnog korijenja tretiranog vodom. Tjedan dana nakon indukcije etanolom u transgenom korijenu linije O3 specifična aktivnost NOX značajno je porasla. Porast specifične aktivnosti NOX ovisio je o koncentraciji etanola u podlozi te je aktivnost kod tretmana 0.1% -tnim etanolom porasla za 54% ($P = 0.003$), dok je aktivnost nakon 1% -tnog tretmana porasla za 98% ($P = 0.00014$) u odnosu na korijenje iste linije tretirano vodom. U linije O6 niti jedna koncentracija etanola nije značajno utjecala na aktivnost NOX. Dva tjedna nakon indukcije *crypt*-linija etanolom, specifična aktivnost NOX u korijenu obje linije raste ovisno o koncentraciji primijenjenog etanola. Tretman 0.1% -tnim etanolom povećao je aktivnost NOX za 41% u linije O3 ($P = 0.013$) i za 63% kod linije O6 ($P = 0.0003$), dok se nakon tretmana 1% -tnim etanolom aktivnost NOX povećava za 60% kod linije O3 ($P = 0.0002$) te za 103% u linije O6 ($P = 0.0002$), u odnosu na korijenje istih linija tretirano vodom.



Slika 28. Specifična aktivnost NOX u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1% -tnim etanolom (EtOH). Kontrolno tkivo tretirano je vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.14.4. Aktivnost superoksid-dismutaze u transgenom korijenju ukrasne koprive

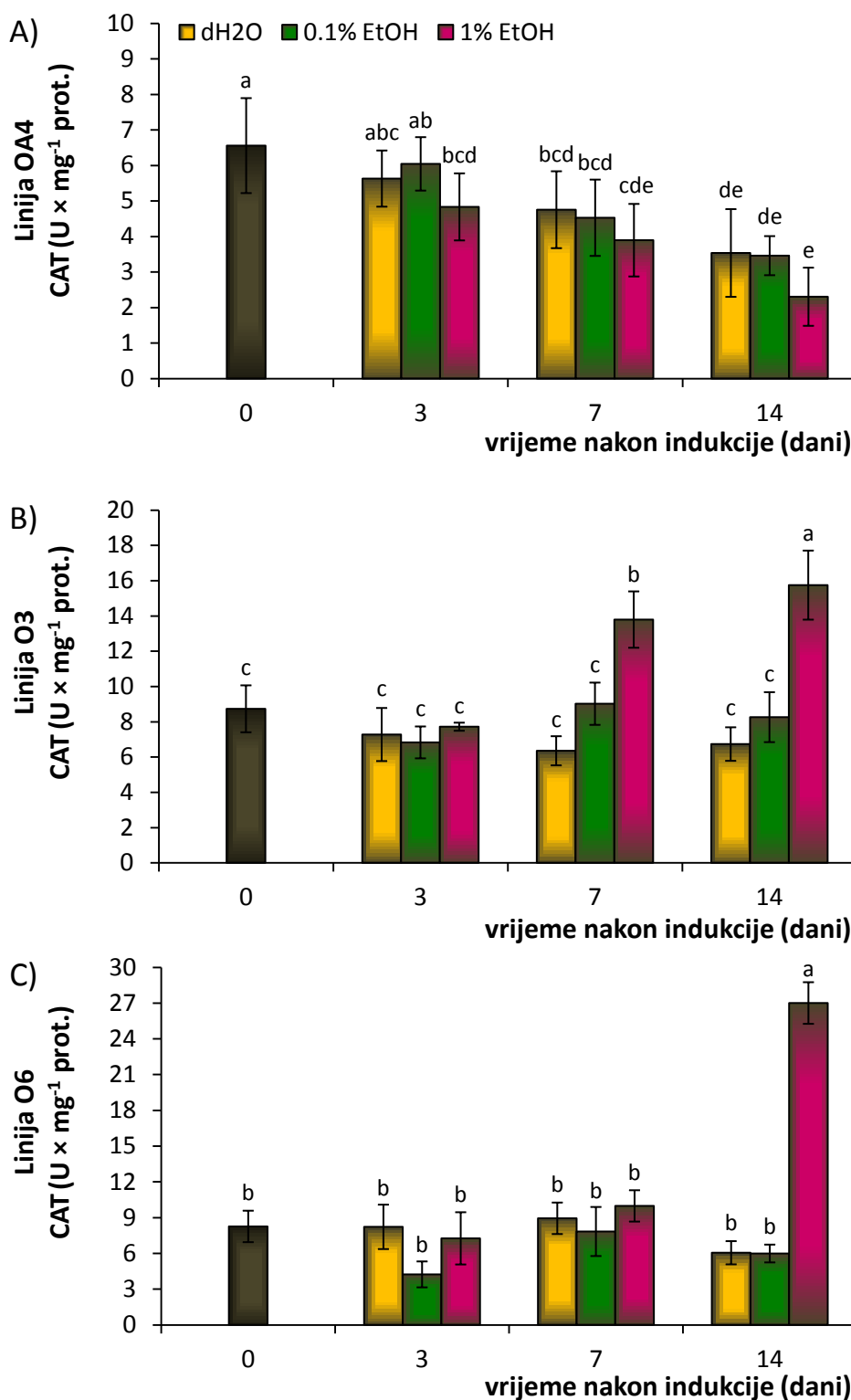
Tretman etanolom nije imao učinak na specifičnu aktivnost SOD u korijenju kontrolne linije OA4; tijekom indukcijskog perioda, nije uočena značajna razlika između specifične aktivnosti SOD u tkivu korijenja tretiranog etanolom (0.1% i 1%) i tkivu korijenja tretiranog vodom (Slika 29). Treći dan nakon tretmana etanolom u obje *crypt*-linije (O3 i O6) specifična aktivnost SOD ostala je nepromijenjena nakon primjene obje koncentracije etanola u odnosu na korijenje istih linija tretirano vodom. Tjedan dana nakon indukcije etanolom (0.1% i 1%) u transgenom korijenju linije O3 specifična aktivnost SOD porasla je za 55% (0.1%, $P = 0.0009$) i 39% (1%, $P = 0.028$) u odnosu na tkivo iste linije tretirano vodom, dok u linije O6 niti jedna koncentracija etanola nije značajno utjecala na aktivnost SOD. Dva tjedna nakon indukcije *crypt*-linija etanolom, specifična aktivnost SOD u korijenju obje linije raste. Tretman linije O3 0.1% -tnim etanolom povećao je aktivnost SOD za 41% ($P = 0.03$) dok je tretman 1% -tnim etanolom povećao aktivnost za 68% ($P = 0.00023$) u odnosu na kontrolno tkivo iste linije tretirano vodom. U linije O6 porast specifične aktivnosti SOD ovisio je o koncentraciji etanola u podlozi te je aktivnost kod tretmana 0.1% -tnim etanolom porasla za 36% ($P = 0.039$), dok je aktivnost nakon 1% -tnog tretmana porasla za 130% ($P = 0.00015$) u odnosu na kontrolno tkivo iste linije tretirano vodom.



Slika 29. Specifična aktivnost SOD u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolno tkivo tretirano je vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.14.5. Aktivnost katalaze u transgenom korijenju ukrasne koprive

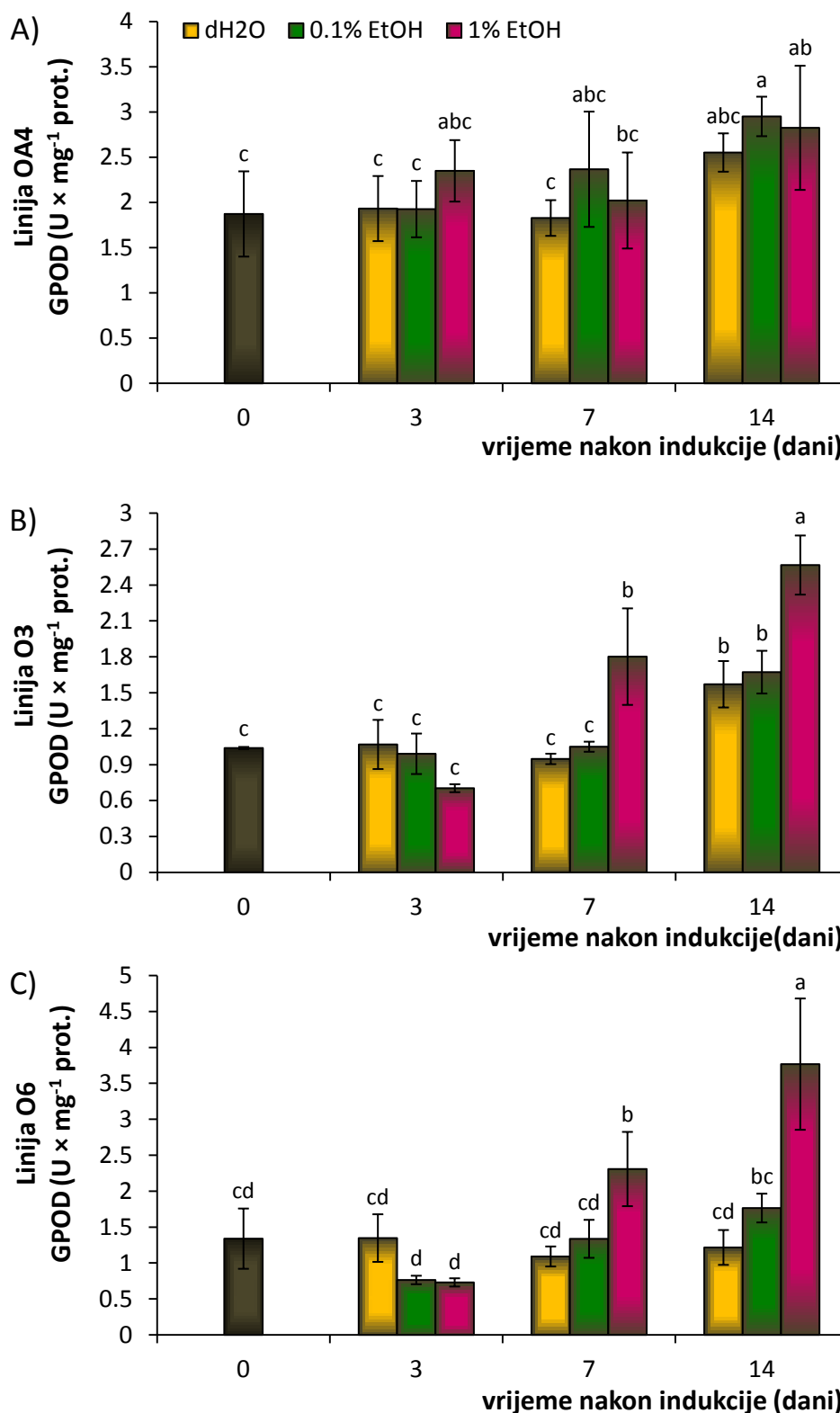
Specifična aktivnost katalaze (CAT) u tkivu transgenog korijenja u kojem je ekspresija gena *crypt* inducirana etanolom prikazana je na Slici 30. Tretman etanolom nije imao učinak na specifičnu aktivnost CAT u korijenju linije OA4; tijekom indukcijskog perioda, nije uočena značajna razlika u specifičnoj aktivnosti CAT u tkivu korijenja tretiranog etanolom (0.1% i 1%) i tkivu korijenja tretiranog vodom. Treći dan nakon tretmana etanolom u obje *crypt*-linije (O3 i O6) nisu uočene značajne razlike u specifičnoj aktivnosti CAT u tkivu korijenja tretiranog etanolom i tkivu kontrolnog korijenja tretiranog vodom. Tjedan dana nakon tretmana 1% -tnim etanolom u transgenom korijenju linije O3 došlo je do značajnog porasta specifične aktivnosti CAT za 117% u odnosu na korijenje iste linije tretirano vodom ($P = 0.00014$), dok je u linije O6 specifična aktivnost CAT nakon tretmana etanolom ostala nepromjenjena u odnosu na kontrolno tkivo tretirano vodom. Dva tjedna nakon indukcije transgenog korijenja 1% -tnim etanolom u obje *crypt*-linije (O3 i O6) došlo je do povećanja specifične aktivnosti CAT u tkivu. Specifična aktivnost CAT u korijenju linije O3 značajno je povećana za 134% ($P = 0.00014$), dok je u korijenju linije O6 povećana za 346% ($P = 0.00013$) u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom.



Slika 30. Specifična aktivnost CAT u transgenom korijenju ukrasne koprive (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1% i 1%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolu predstavlja korijenje istih linija tretirano vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

4.14.6. Aktivnost gvajakol-peroksidaza u transgenom korijenju ukrasne koprive

Specifična aktivnost gvajakol-peroksidaza (GPOD) u tkivu transgenog korijenja u kojem je ekspresija gena *crypt* inducirana etanolom prikazana je na Slici 31. Tretman etanolom nije imao učinak na specifičnu aktivnost GPOD u korijenju linije OA4; tijekom induksijskog perioda, nije uočena značajna razlika u specifičnoj aktivnosti GPOD u tkivu korijenja tretiranog etanolom (0.1% i 1%) i tkivu korijenja tretiranog vodom. Treći dan nakon tretmana etanolom u obje *crypt*-linije (O3 i O6) nisu uočene značajne razlike u specifičnoj aktivnosti GPOD u tkivu korijenja tretiranog etanolom i tkivu kontrolnog korijenja tretiranog vodom. Tjedan dana nakon tretmana korijenja 1% -tnim etanolom u obje *crypt*-linije došlo je do značajnog porasta specifične aktivnosti GPOD za 90% u linije O3 ($P = 0.0002$) te za 112% u linije O6 ($P = 0.0085$), u odnosu na kontrolno korijenje. Indukcija 1% -tnim etanolom značajno je povećala specifičnu aktivnost GPOD i nakon dva tjedna u obje *crypt*-linije, dok je specifična aktivnost GPOD u tkivu induciranom 0.1% -tnim etanolom ostala nepromjenjena u odnosu na kontrolno tkivo tretirano vodom. Specifična aktivnost GPOD u korijenju linije O3 povećana je za 63% ($P = 0.0002$), dok je u korijenju linije O6 povećana za 210% ($P = 0.00013$) u odnosu na kontrolno korijenje.



Slika 31. Specifična aktivnost GPOD u transgenom korijenju (linija OA4 - A, O3 - B, O6 - C) prije te 3., 7. i 14. dan nakon indukcije ekspresije gena *crypt* 0.1 i 1%-tnim etanolom (EtOH). Kontrolno tkivo tretirano vodom (dH₂O). Rezultati (n = 9) su prikazani kao srednje vrijednosti ± SD. Slova označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina unutar linije (P < 0.05).

5. RASPRAVA

5.1. Utjecaj genetičke elicitacije na sintezu fenolnih spojeva u transgenom korijenju ukrasne koprive

Veliki farmakološki značaj fenolnih spojeva vodio je ka brojnim istraživanjima različitih strategija koje bi doprinijele povećanju njihove sinteze u biljkama. Jedan od pristupa ka povećanju sinteze komercijalno važnih sekundarnih metabolita uključuje transformaciju bakterijom *A. rhizogenes* (Ray i sur. 1996, Chaudhuri i sur. 2005) u svrhu dobivanja kulture kosmatog korijenja, koja često akumulira sekundarne metabolite u znatno većoj količini u odnosu na samu biljku (Georgiev i sur. 2007). Također, sinteza biljnih sekundarnih metabolita može se povećati i manipulacijom specifičnih gena (Hashimoto i sur. 1993, Canel i sur. 1998) ili indirektnim pristupom, kao što je npr. tretman elicitorima koji simuliraju napad patogena (Menke i sur. 1999, Zhao i sur. 2004). Kombinacije ovih strategija mogu imati sinergistički učinak te doprinijeti poboljšanoj akumulaciji sekundarnih metabolita (Majumdar i sur. 2012). U svrhu povećanja sinteze i sekrecije fenolnih spojeva, posebno RA i CAF u tkivu ukrasne koprive, u ovom istraživanju kombinirane su sve tri navedene strategije. Kombinacija navedenih strategija omogućena je upotrebom gena *crypt* koji kodira oomicetalni elicitor, a koji je u biljni genom unešen pomoću bakterije *A. rhizogenes*. Ovaj indirektni pristup otklanja potrebu za detaljnim poznavanjem biokemije i genetike, ali ne funkcionira na svim vrstama jednako (Chaudhuri i sur. 2009). Biosintetski putevi i njihov mehanizam regulacije za većinu sekundarnih metabolita nisu dovoljno poznati, tako da je učinak elicitacije biljnih kultura vrlo teško predvidjeti.

Kako bi predvidjeli učinke proteinskog produkta transgena *crypt* na sintezu fenolnih spojeva u tkivu ukrasne koprive, kosmato korijenje kontrolne linije OA4 koja ne sadrži transgen *crypt*, tretirano je rekombinantnim β -kriptogeinom. Prema dobivenim rezultatima, tretman β -kriptogeinom stimulirao je akumulaciju fenolnih spojeva u tkivu ukrasne koprive kao i njihovu sekreciju u tekuću hranjivu podlogu (Slika 9). Odgovor kulture kosmatog korijenja na tretman β -kriptogeinom, sličan je onome kojeg su u svojem istraživanju dobili Chaudhuri i sur. (2009). Prema njihovom istraživanju, tretman kosmatog korijenja zimske trešnje i ladoleža β -kriptogeinom stimulira rast kosmatog korijenja u obje vrste, dok u korijenju ladoleža stimulira i povećanu sintezu kalistegina (Chaudhuri i sur. 2009). Budući da bi povećana sinteza fenolnih spojeva i njihova sekrecija u tekuću hranjivu podlogu mogla imati značajnu biotehnološku primjenu, dobiveni rezultati bili su poticaj za transformaciju ukrasne koprive genom *crypt*. Upotrebom

bioinformatičkih alata predviđeno je da će se endogeno sintetizirani β -kriptogein secernirati van stanice te potaknuti obrambeni odgovor stanice, koji između ostalog vodi i ka povećanoj sintezi sekundarnih metabolita.

Dosadašnja istraživanja pokazuju osjetljivost ukrasne koprive na zaražavanje divljim sojevima agrobakterija, a utvrđeni su i optimalni uvjeti za transformaciju eksplantata listova ukrasne koprive i regeneraciju kosmatog korijenja (Bauer i sur. 2002). Na temelju poznatih metoda transformacije, indukcije i selekcije transgenog korijenja, na lisnim je eksplantatima ukrasne koprive uspješno potaknut razvoj velikog broja korijenčića.

Nekoliko istraživanja opisuje transformaciju genom *crypt* s ciljem postizanja rezistencije na napad patogena i povećane sinteze sekundarnih metabolita (Tepfer i sur. 1998, Keller i sur. 1999, Donghua i sur. 2004, Chaudhuri i sur. 2009, Majumdar i sur. 2012). U dosadašnjim istraživanjima gen *crypt* kontroliran je različitim promotorima, kao što su jaki konstitutivni 35S CaMV promotor (Tepfer i sur. 1998, Chaudhuri i sur. 2009, Majumdar i sur. 2012), promotor enzima fenilalanin-amonij lijaze iz riže s niskom razinom konstitutivne ekspresije (Donghua i sur. 2004) i patogen-inducibilni promotor *hsr203J* (Keller i sur. 1999). U mojem istraživanju ekspresija gena *crypt* bila je kontrolirana inducibilnim promotorom reguliranim alkoholom. Ovim promotorom moguće je kontrolirati vrijeme i razinu ekspresije gena *crypt*. Upotrebom inducibilnih promotora mogu se izbjeći i štetne posljedice do kojih može doći uslijed konstitutivne ekspresije gena (Hammond-Kosack i sur. 1994). U slučaju β -kriptogaina stvaranje hipersenzitivnog odgovora mora biti strogo regulirano kako bi se izbjegla stanična smrt (Keller i sur. 1999). U ovom je istraživanju kao induktor inducibilnog ekspresijskog sustava bio upotrijebljen etanol. Od svih testiranih induktora, najveća razina ekspresije transgena postiže se etanolom (Garossi i sur. 2005, Filichkin i sur. 2006). Konačne koncentracije etanola upotrijebljene za indukciju gena *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive bile su određene preliminarno provedenim eksperimentom, a iznose 1% (v/v) i 2% (v/v). Pokazano je da su koncentracije etanola u rasponu 1 - 2% također učinkoviti aktivatori inducibilnog promotora u rajčici (pri zalijevanju korijenja, Garossi i sur. 2005), u sadnicama uročnjaka (Roslan i sur. 2001) i u topoli (Filichkin i sur. 2006). U sva tri istraživanja, uključujući i moje, čini se da veće koncentracije etanola i produljena aplikacija uzrokuju stres u biljaka (Roslan i sur. 2001, Garossi i sur. 2005, Filichkin i sur. 2006).

Inducibilni promotori omogućavaju upotrebu jedne transgene linije i kao negativne kontrole i kao eksperimentalne linije te se na taj način umanjuje problem koji može nastati zbog varijacije u klonovima. Unatoč tome u ovom istraživanju bila je korištena i kontrolna OA4 linija koju čini kultura kosmatog korijenja dobivena transformacijom pomoću bakterije *A. rhizogenes* soja A4 (pRiHRI), a koja ne sadrži gen *crypt* (Bauer i sur. 2009). Linija OA4 bila je upotrijebljena za testiranje učinka različitih koncentracija etanola *per se*. Etanol je značajno smanjio rast kosmatog korijenja sedam dana nakon tretmana (Slika 18). Tretman etanolom nije imao učinak na akumulaciju ukupnih topljivih fenola u korijenu linije OA4 (Slika 19), kao niti na njihovu sekreciju u tekuću hranjivu podlogu (Slika 20). Rezultati HPLC analize također su pokazali kako etanol nije djelovao na akumulaciju RA i CAF u tkivu transgenog korijenja (Slika 21, 23). Ipak, HPLC analiza hranjive podloge pokazala je da 2% -tni etanol pomaže sekreciju fenolnih spojeva u hranjivu podlogu (Slika 24).

PCR analiza potvrdila je uspješnost genetičke transformacije u linija O3, O5 i O6 umnažanjem gena *crypt* i odsječka gena *orf13* (Slika 13), dok je metodom RT-PCR potvrđena prisutnost transkripta gena *crypt* (Slika 14). Transkripti gena *crypt* su bili prisutni u svim *crypt*-linijama tretiranim etanolom, dok u korijenu tretiranom vodom nije došlo do ekspresije gena *crypt* (Slika 15). Rezultati semi-kvantitativne RT-PCR analize pokazali su veću razinu ekspresije u transgenom korijenu tretiranom 2% -tnim etanolom u odnosu na tkivo tretirano 1%-tnim etanolom. Etanol *per se* nije imao utjecaja na ekspresiju β -aktina. Dobiveni rezultati su pokazali kako razina ekspresije može biti kontrolirana različitim koncentracijama etanola.

Prema istraživanju Bourque i sur. (1999) β -kriptogein svoj učinak na stanice ostvaruje vezanjem na membranski receptor, a da bi to bilo moguće endogeno se sintetizirani protein mora secernirati izvan stanice. Istraživanja koja su objavili Tercé-Laforgue i sur. (1992) te Panabières i sur. (1998) pokazuju kako se β -kriptogein ekspimiran u fitoftori *P. cryptogea* i heterologno ekspimiran u vrsti *P. infestans* sintetizira kao pre-protein sa N-terminalnim signalnim peptidom veličine 20 aminokiselinskih ostataka, koji se uklanja kotranslacijski neposredno prije sekrecije u hranjivu podlogu. U ovom je istraživanju različitim bioinformatičkim programima (Tablica 5) bilo predviđeno “ponašanje” endogeno sintetiziranog β -kriptogaina u biljnoj stanici. Rezultati bioinformatičke analize aminokiselinskog slijeda β -kriptogaina pokazali su da se endogeno sintetizirani β -kriptogein vrlo vjerojatno secernira van stanice. Bioinformatička

analiza programom WOLF PSORT ukazala je i na mogućnost da je β -kriptogein, osim izvan stanice, lokaliziran i unutar kloroplasta, no kako kloroplasti nisu prisutni u korijenskom tkivu vrlo je vjerojatno da se β -kriptogein secernira van stanice (Tablica 5). N-terminalni signalni peptid, čija je prisutnost bila određena SignalP 4.1 serverom, olakšava kretanje i omogućava izvanstaničnu secernaciju β -kriptogeina (Slika 16). Rezultate bioinformatičkog predviđanja stanične lokalizacije β -kriptogeina potvrdili su rezultati dobiveni SDS-PAGE analizom izvanstaničnih proteina. Na elektroforegramu izvanstaničnih proteina *crypt*-linija (O3 i O6) tretiranih etanolom utvrđena je prisutnost specifične proteinske vrpce, čija veličina odgovara molekularnoj masi od nešto više od 10 kDa (Slika 17). Činjenica da protein veličine oko 10 kDa nije bio prisutan u tekućoj hranjivoj podlozi linije OA4 tretirane etanolom, kao niti u hranjivim podlogama *crypt*-linija tretiranih vodom ukazuje da bi dobivena proteinska vrpca mogla biti β -kriptogein. Prema rezultatima predviđanja, učinjenim softverskim alatom ExPASy Compute pI/Mw, molekulska masa β -kriptogeina iznosi 10.4 kDa. Dobiveni rezultati ukazuju na vjerojatnost da se endogeno sintetiziran β -kriptogein secernira izvan stanice te se veže na receptor na plazma membrani. Preko interakcije s receptorom, koja potiče prijenos signala koji vodi ka ekspresiji transkripcijskih faktora, β -kriptogein elicitira obrambeni odgovor stanice koji utječe i na sekreciju sekundarnih metabolita. Ova hipoteza ne isključuje niti vjerojatnost da endogeno sintetizirani β -kriptogein svoj učinak ostvaruje i na neki drugi način npr. djelujući unutar same biljne stanice. U svakom slučaju, dobiveni rezultati ukazali su na to da β -kriptogein, bilo egzogeno primijenjen ili endogeno sintetiziran u biljnim stanicama, utječe na metabolizam sekundarnih metabolita. S ciljem boljeg razumijevanja biokemijskih procesa koje izazivaju elicítani, mnogi su znanstvenici proučavali učinke β -kriptogeina na suspenziju stanica duhana. Mehanizam djelovanja ovog elicitora uključuje mnoge biokemijske događaje uključujući promjene u strujanju iona, fosforilaciju proteina, aktivaciju NADPH-oksidade i protein-kinaze, kao i stvaranje reaktivnih kisikovih jedinki (Viard i sur. 1994, Tavernier i sur. 1995, Pugin i sur. 1997, Lebrun-Garcia i sur. 1998, Kieffer i sur. 2000, Leborgne-Castel i sur. 2008). U stanicama duhana BY-2, egzogeno primijenjen β -kriptogein povećava transkripciju većine gena koji su uključeni u fenilpropanoidni put te u ovisnosti o kalciju inducira ranu akumulaciju fenolnih spojeva koji se vezuju na staničnu stijenkku (Amelot i sur. 2011).

Povećanje rasta korijenja u sve četiri transgene linije (OA4, O3, O5 i O6) bilo je prisutno do 7. dana od tretmana etanolom (11. dan subkulture), nakon čega su sve linije

ušle u stacionarnu fazu rasta. Na rast transgenog korijenja utjecali su i etanol i β -kriptogein (Slika 18). Indukcija etanolom smanjila je rast transgenog korijenja *crypt*-linija (O3 i O6). Inhibitorni učinak etanola rastao je ovisno o koncentraciji primijenjenog etanola. Redukcija rasta uzrokovana etanolom u linije OA4 bila je izraženija nego u *crypt*-linija. Osim toga, u linije O5 nije došlo do značajnog smanjenja rasta u odnosu na korijenje tretirano vodom. Prema tome, iako je etanol imao negativan učinak na rast korijenja, njegov je učinak donekle umanjila ekspresija gena *crypt*. Ovaj pozitivan učinak β -kriptogeina na rast korijenja sukladan je rezultatima koje su dobili Chaudhuri i sur. (2009). Ekspresija β -kriptogeina stimulira rast transgenog korijenja zimske trešnje, ladoleža i tilofore (Chaudhuri i sur. 2009) te povećanje biomase u *crypt*-transgene bakope (Majumdar i sur. 2012). Iako postoje i studije koje opisuju inhibitorno djelovanje nekih fungalnih elicitora na rast stanica (Chen i Chen 2000), u našem slučaju taj je učinak vjerojatno uzrokovan etanolom, a ne β -kriptogeinom. Povećanje rasta tkiva uslijed elicitacije vjerojatno se javlja kao obrambeni odgovor na stres. Pojava nekroza uzrokovana napadom patogena u jednom dijelu korijenskog sustava kompenzira se povećanim rastom u drugom dijelu korijenskog sustava (Chaudhuri i sur. 2009). Razlog općenito niskom indeksu rasta linija u ovom istraživanju (0.02-0.04) bio je vrlo visoka početna masa korijenja (Slika 18); oko 1 g korijenja bilo je subkultivirano u 8 mL hranjive podloge. Stoga je zbog ograničene količine nutrijenata i fizičke barijere koju čini Petrijeva zdjelica indeks rasta bio nizak te su i same kulture ušle ranije u stacionarnu fazu rasta. Inače, korijenčići su rasli u dvije faze; u prvoj fazi koja je trajala dva tjedna induciran je rast korječića, dok je u drugoj fazi inducirana sinteza sekundarnih metabolita ekspresijom gena *crypt* (u ovoj je fazi praćen i utjecaj β -kriptogeina na GI). Na ovaj način bilo je omogućeno oponašanje uvjeta kontinuirane kulture kosmatog korijenja. Osim toga, subkultiviranje veće količine korijenja omogućilo je uzorkovanje tkiva u određenim vremenskim intervalima iz iste Petrijeve zdjelice u količini dovoljnoj za sve potrebne analize. GI transgenog korijenja u 1. fazi rasta bio je određen preliminarnim ekperimentom (u situaciji kada je oko 200 mg tkiva kultivirano u 8 mL hranjive podloge) te je za linije OA4, O3 i O6 iznosio 4-5, dok je za liniju O5 bio oko 3. Indeks rasta ovih linija veći je za otprilike dva reda veličine u odnosu na situaciju kad je u istim uvjetima kultivirano 1 g tkiva.

Ukupni topljivi fenoli i RA u tkivu sve tri *crypt*-linije (O3, O5 i O6) akumulirali su se po vrlo sličnom obrascu (Slike 19, 21). Maksimalna akumulacija ukupnih topljivih fenola i RA u kontrolnom korijenju tretiranom vodom bila je zabilježena u stacionarnoj

fazi rasta (14. dan u linije O3 i O6 te 21. dan nakon indukcije etanolom u linije O5), dok su se sadržaji fenolnih spojeva i RA u korijenju *crypt*-linija smanjivali, ovisno o koncentraciji etanola korištenog za indukciju korijenja. Tijekom indukcijskog perioda, ekspresija gena *crypt* uzrokovala je značajno smanjenje sadržaja ukupnih topljivih fenola u transgenom korijenju ovisno o koncentraciji etanola. Dobiveni rezultati bili su suprotni onima koje su u svojem istraživanju dobili Chaudhuri i sur. (2009) te Majumdar i sur. (2012). Chaudhuri i suradnici (2009) u svojim su istraživanjima pokazali da je transformacija genom *crypt* povezana sa stimulacijom sinteze kalistegina u kulturi transgenog korijenja ladoleža te vitaferina u transgenom korijenju zimske trešnje. Osim toga, genetička transformacija genom *crypt* vodi i ka povećanju koncentracije kalistegina u transgenom poljskom slaku te određenih flavonoida u sjemenu transgenog uročnjaka (Chaudhuri i sur. 2009). U istraživanju Majumdar i sur. (2012), transgene biljke bakope koje eksprimiraju gen *crypt* pokazuju značajno povećanje sadržaja bakopa saponina u odnosu na biljke divljeg tipa. Iznimka je transgeno korijenje tilofore kod kojeg ekspresija β -kriptogeina ne doprinosi povećanju sadržaja tiloforina (Chaudhuri i sur. 2009). Izostanak porasta sadržaja sekundarnih metabolita mogao bi biti posljedica već prisutne visoke stope sinteze u korijenju koje je dobiveno transformacijom s Ri T-DNA. Stoga je moguće da daljnja akumulacija metabolita može biti spriječena ograničenom dostupnošću ugljika i/ili toksičnim koncentracijama metabolita (Choudhuri i sur. 2005, 2009).

Iako u ovom istraživanju indukcija gena *crypt* u transgenom korijenju nije bila povezana s akumulacijom fenolnih spojeva u tkivu, bila je povezana sa stimulacijom sekrecije fenolnih spojeva u tekuću hranjivu podlogu (Slike 20, 24). Budući da etanol *per se* nije imao učinak na sadržaj ukupnih topljivih fenola u tkivu i hranjivoj podlozi linije OA4, dobiveni podaci ukazuju na činjenicu da je ekspresija gena *crypt* odgovorna za povećani sadržaj fenolnih spojeva u hranjivoj podlozi, kao i za smanjenje razine ukupnih fenola i RA u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive. Međutim, pokazano je da i tretman linije OA4 2% -tnim etanolom doprinosi sekreciji RA i CAF u tekuću hranjivu podlogu. Iako je sekrecija u usporedbi sa sekrecijom u *crypt*-linija značajno manja, uočeno je da i 2%-tni etanol doprinosi propusnosti membrane. Sekrecija fenolnih spojeva u *crypt*-linijama kontrolirana je razinom ekspresije β -kriptogeina koja je pak kontrolirana različitom koncentracijom etanola. Niže količine topljivih i netopljivih fenola stanične stijenke u *crypt*-linijama tretiranim etanolom također su bile uočene mjerenjem intenziteta autofluorescencije, koji je bio manji u odnosu na korijenje tretirano vodom te se nije

mijenjao u tretirane i netretirane linije OA4 (Slika 25). To je također posljedica sekrecije fenola van stanice, odnosno posljedica ekspresije gena *crypt*. Na temelju mjerenja ukupnih fenola, linije O3 i O6 su maksimum sekrecije postigle dva tjedna nakon indukcije 2% -tnim etanolom, dok je u linije O5 maksimum sekrecije bio postignut tri tjedna nakon indukcije 1% -tnim etanolom u odnosu na kontrolno korijenje tretirano vodom. Indeks rasta linije O5 bio je značajno manji (slika 18) u odnosu na druge dvije linije, tako da je i ulazak ove linije u stacionarnu fazu rasta nešto kasniji te bi to mogao biti razlog kasnije zabilježene maksimalne sekrecije fenolnih spojeva. Nakon trećeg tjedna indukcije ekspresije gena *crypt* korijenje je zbog nedostatka hranjivih tvari u podlozi potamnilo i nekrotiziralo. Nedostatak hranjivih tvari bio je vjerojatno uzrok i smanjenoj sekreciji 21. dan u linija O3 i O6. Tendencija opadanja vrijednosti fenolnih spojeva prisutna u kontrolnom tkivu, 21. dan u odnosu na 14. dan, moguće je da se također javlja zbog nedostatka nutrijenata u hranjivoj podlozi odnosno zbog starosti tkiva. U kontinuiranim kulturama ovo se može izbjeći dodatkom hranjiva. Razlike u rastu korijenja i sekreciji fenolnih spojeva između pojedinih *crypt*-linija bile su očekivane, budući je svaka linija dobivena različitim transformacijskim događajem. Linije se međusobno razlikuju prema mjestu ugradnje gena kao i po broju kopija gena u biljnom genomu te su iz tog razloga prisutne i varijacije među njima. Unatoč prisutnim razlikama sve su *crypt*-linije nakon indukcije etanolom secernirale značajno više ukupnih topljivih fenola, RA i CAF u odnosu na neinducirano kontrolno korijenje, kao i u odnosu na liniju OA4.

Akumulacija sekundarnih metabolita u hranjivoj podlozi kosmatog korijenja zabilježena je u više istraživanja, npr. akumulacija glukozinolata u repi (Kastell i sur. 2011), alkaloida u madagaskarskom zimzelenu (Li i sur. 2011), terpenoida u muškatnoj kadulje (Kuzma i sur. 2009) te flavonoida u sladića (Zhang i sur. 2011). Odgovor na biotički elicitor, dobiven u ovom radu, bio je sličan odgovoru kojeg su u svojem istraživanju dobili Bais i sur. (2002), koji su u eksudatu kosmatog korijenja bosiljka elicitanog ekstraktom stanične stijenke fitofitore *Phytophthora cinnamoni* identificirali RA. Nadalje, uočili su da korječići bosiljka *in situ* tretirani oomicetom *Pythium ultimum* izlučuju kapljice RA na vrhu korijenova vrška, dok u isto vrijeme netretirano korijenje ne izlučuje RA. Autori navode da je otpuštanje antimikrobnih spojeva, kao što je RA, u okoliš biljnog tkiva stimulirano mikrobima. Osim toga, pokazali su antimikrobno djelovanje RA protiv niza mikroorganizama tla, što upućuje na značajnu ulogu eksudata korijena na interakciju biljke i patogena. U našem slučaju otpuštanje fenola bilo je stimulirano

ekspresijom transgena za oomicetalni elicitor. Georgiev i sur. (2007) u svojem istraživanju govore o sekreciji RA u hranjivu podlogu stanične kulture lavande uslijed abiotičke elicitacije. Iz navedenih primjera vidljivo je da osim na akumulaciju sekundarnih metabolita u tkivu, elicitori mogu utjecati i na njihovu sekreciju u hranjivu podlogu (Kiddle i sur. 1994, Cai i sur, 2012). Objavljena su brojna istraživanja u kojima je manipulirano hranjivim podlogama s ciljem povećanja propusnosti membrane i sekrecije važnih sekundarnih metabolita (Smetanska 2008). Propusnost stanica, odnosno membrane ovisi o stvaranju pora u jednom ili više membranskih sustava, koje omogućuju prolazak molekula van stanice (Brodellius i Pedersen 1993), a može se mijenjati primjenom različitih kemijskih i fizikalnih tretmana (Engels i sur. 2000). Tako je npr. otpuštanje betacijanina iz kosmatog korijenja cikle postignuto smanjenjem razine kisika i zagrijavanjem kulture, sa minimalnim učinkom na vijabilnost tkiva (Dilorio i sur. 1993). Tretman Tweenom 20 utjecao je na propusnost membrane te doprinio otpuštanju velike količine hiosciamina iz korijenja dature (Boitel-Conti i sur. 1996). Medina-Bolivar i sur. (2007) izvjestili su o sekreciji resveratrola u hranjivu podlogu kosmatog korijenja kikirikija induciranog natrijevim acetatom. Tween 80 značajno stimulira sekreciju likokalkona i ukupnih flavonoida u hranjivu podlogu kosmatog korijenja sladića, bez utjecaja na staničnu vijabilnost (Zhang i sur. 2011). Eksudati se iz stanice otpuštaju putem najmanje dva mehanizma, pasivno (difuzati) i aktivno (sekreti). Trenutno se malo zna o molekularnim mehanizmima za prijenos ovih molekula.

Jedno od najplodnijih područja istraživanja koja se odnose na proizvodnju sekundarnih metabolita je proučavanje metoda za indukciju otpuštanja ili sekrecije sekundarnih metabolita iz stanice u hranjivu podlogu. Sposobnost kosmatog korijenja da secernira značajne sekundarne metabolite u tekuću hranjivu podlogu može reducirati velike troškove procesa izolacije i pročišćavanja metabolita jer ne dolazi do uništavanja vrijedne biomase (Boitel-Conti i sur. 1996, Cai i sur. 2012). U ovom radu sekrecija važnih sekundarnih metabolita bila je postignuta genetičkom elicitacijom. Na ovaj je način omogućena jednostavnija, brža i jeftinija ekstrakcija fenola (RA i CAF) iz tekuće hranjive podloge transgenog korijenja, nego što je iz tkiva. Sekrecija se sve više prepoznaje kao potencijalni izvor vrijednih fitokemikalija, ali je i dalje potrebno mnogo istraživanja da bi sekrecija postala stabilan i produktivan izvor sekundarnih metabolita.

Elicitori nemaju jednak učinak u svim biljnim vrstama. Ukoliko se primjene u odgovarajućoj fazi rasta kulture, u odovarajućoj koncentraciji te pri odgovarajućem sastavu

hranjive podloge, elicitori mogu regulirati čimbenike odgovorne za povećavanje sekrecije sekundarnih metabolita (Cai i sur. 2012). Osim toga, biosinteza određenog sekundarnog metabolita ovisi i o njegovoj ulozi u stanici. Naši su rezultati pokazali da se β -kriptogein sintetiziran unutar transgenih biljnih stanica secernira van stanice te stimulira otpuštanje fenolnih spojeva, RA i CAF iz tkiva. Stoga bi se potencijalno mogao koristiti za regulaciju sekrecije značajnih sekundarnih metabolita. Istraživanje učinka gena *crypt* iz oomicete unešenog u biljni genom doprinosi boljem razumijevanju funkcije proteinskih elicitora u interakciji biljke i patogena, procjeni mogućnosti upotrebe transgena koji kodiraju elicitore za poticanje biosinteze i izlučivanja značajnih sekundarnih metabolita te unaprijeđenju biotehnološke proizvodnje ružmarinske i kavene kiseline.

5.2. Utjecaj genetičke elicitacije na antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive

Osim što se koriste u proizvodnji fitokemikalija, biotički elicitori se zbog svojstva da induciraju obrambeni odgovor biljke često koriste i za povećanje otpornosti biljaka na patogene ali i na druge okolišne stresne čimbenike. Uslijed napada patogena dolazi do sinteze ROS-a čije nakupljanje u stanicama može izazvati oksidacijski stres (Bowell 2001). Biokemijski mehanizmi na kojima se temelji indukcija zaštite duhana tretiranog β -kriptogeinom, uključuju pojačano nastajanje ROS-a (Viard i sur. 1994, Rusterucci i sur. 1996, Simon-Plas i sur. 1997). Kako bi se procijenio učinak endogeno sintetiziranog β -kriptogaina na pojavu oksidacijskog stresa u transgenom tkivu ukrasne koprive bili su određeni količina H_2O_2 i razina lipidne peroksidacije. Za istraživanje oksidacijskog/antioksidacijskog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive bile su odabrane tri linije; linija O3 i linija O6 koje sadrže gen *crypt* te linija OA4 kao kontrolna linija bez gena *crypt*. Linije O3 i O6 odabrane su zbog svojeg većeg indeksa rasta (oko 5), u odnosu na liniju O5. Linija OA4 bila je upotrijebljena za testiranje učinka različitih koncentracija etanola *per se*, tijekom indukcijskog perioda, na oksidacijski/antioksidacijski status kosmatog korijenja ukrasne koprive. Jedini značajni učinak etanola bio je uočen treći dan nakon tretmana tkiva. Etanol je imao utjecaj na povećanje sadržaja H_2O_2 i MDA u korijenju, što upućuje na pojavu oksidacijskog stresa uslijed tretmana etanolom (Slike 26A, 27A). Nakon tjedan dana su razine H_2O_2 i MDA u kontrolnom tkivu tretiranom vodom bile dostigle vrijednosti odgovarajućih razina u tretiranom tkivu te do kraja

indukcijskog perioda nije bilo značajnih promjena (Slika 26A, 27A). Tretman etanolom nije imao učinak na aktivnosti enzima NOX, SOD, CAT i GPOD, što znači da nije imao utjecaja na antioksidacijski status tkiva (Slika 28A, 29A, 30A, 31A).

Mjerenjem pokazatelja oksidacijskog stresa (H_2O_2 i MDA) u mojem je istraživanju ustanovljeno kako elicitacija endogeno sintetiziranim β -kriptogeinom ne uzrokuje oštećenja koja mogu nastati uslijed oksidacijskog stresa, tj. potvrđena je odsutnost oksidacijskog stresa u transgenom korijenju ukrasne koprive. Smatra se da je H_2O_2 , proizveden tijekom oksidacijskog stresa, povezan s obranom od patogena (Dorey i sur. 1999). Prema istraživanju Radmana i sur. (2003) nakon tretmana biljke ili kulture biljnih stanica elicitorima, inducira se proizvodnja ROS-a kao što su superoksidni anioni i H_2O_2 . Brojna istraživanja pokazuju kako je jedan od najranijih odgovora biljnih stanica na djelovanje β -kriptogeina proizvodnja ROS-a. Prema istraživanju Viarda i sur. (1994), 60 minuta nakon tretmana kulture stanica duhana β -kriptogeinom dolazi do brze proizvodnje ROS-a. U mom istraživanju treći dan nakon tretmana tkiva etanolom nisu bile uočene promjene u razini H_2O_2 . Osim toga, tjedan dana nakon tretmana linije O3, količina H_2O_2 opada ovisno o koncentraciji etanola u tekućoj hranjivoj podlozi, dok je nakon dva tjedna količina H_2O_2 padala nakon tretmana 1%-tnim etanolom (Slika 26B). Količina H_2O_2 u tretiranom korijenju linije O6 tijekom cijelog indukcijuskog perioda ostala je nepromjenjena, u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 26C).

Jedan od najčešće korištenih pokazatelja učinka oksidacijskog stresa na lipide je mjerenje akumulacije MDA, najobilnijeg prirodnog produkta lipidne peroksidacije. Peever i Higgins (1989) u svojim istraživanjima pokazuju kako je lipidna peroksidacija indikator oksidativnog stresa nastalog nakon tretmana elicitorima. U ovom istraživanju, u obje *crypt*-linije (O3 i O6) tijekom indukcijuskog perioda nisu bile uočene značajne razlike u količini MDA između korijenja tretiranog etanolom i kontrolnog korijenja tretiranog vodom (Slika 27B, C). Stallaert i sur. (1995) istraživali su različite odgovore duhana do kojih dolazi uslijed tretmana β -kriptogeinom. Njihova zapažanja pokazuju da tretiranje lista duhana β -kriptogeinom dovodi do lipidne peroksidacije. Lipidna je peroksidacija kod lista duhana povezana sa hipersenzitivnim odgovorom induciranim β -kriptogeinom (Rustèrucci i sur. 1999). U mojem istraživanju, nepromjenjena razina lipidne peroksidacije nakon tretmana *crypt*-linija etanolom posljedica je smanjene (ili nepromjenjene) razine H_2O_2 (Slika 26B, C). Navedeni literaturni podaci ukazuju na nakupljanje H_2O_2 i MDA uslijed elicitacije β -kriptogeinom. Međutim, u okviru ovog istraživanja, iako je pojava oksidacijskog stresa

bila očekivana, koncentracija H_2O_2 i razina LPO u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive s eksprimiranim β -kriptogeinom nije bila značajno povišena u odnosu na kontrolno tkivo bez β -kriptogaina, što ukazuje da stanice nisu bile izložene oksidacijskom stresu. Razlog smanjenim, odnosno nepromjenjenim razinama H_2O_2 i MDA, u mojem istraživanju, mogu biti povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT i GPOD) do kojih dolazi uslijed ekspresije β -kriptogaina.

Jedan od prvih događaja u biljnoj stanici nakon prepoznavanja patogena, odnosno nakon tretmana elicitorom, je aktivacija enzima NOX (Keller i sur. 1998, Lebrun-Garcia i sur. 1999). Upotreba specifičnih inhibitora pokazuje kako su NADPH-oksidaza membrane i peroksidaze stanične stijenke odgovorni za prolaznu sintezu ROS-a (Bottin i sur. 1994, Pugin i sur. 1997, Grant i sur. 2000) nakon infekcije patogenom. Osim navedenih, još je nekoliko enzima uključeno u proizvodnju ROS-a nakon uspješnog prepoznavanja patogena (Torres i sur. 2006). U mojem je istraživanju do porasta specifične aktivnosti NOX u tkivu transgenog korijenja bilo došlo tjedan dana nakon indukcije etanolom samo u linije O3. Porast aktivnosti NOX ovisio je o koncentraciji etanola u podlozi, odnosno o razini ekspresije β -kriptogaina. Dva tjedna nakon indukcije *crypt*-linija etanolom, specifična aktivnost NOX u korijenju obje *crypt*-linije rasla je ovisno o koncentraciji primijenjenog etanola. Torres i suradnici (2002) u svojem istraživanju pokazuju kako odsutnost gena za NADPH-oksidazu kod uročnjaka smanjuje proizvodnju H_2O_2 , a time smanjuje i obrambene reakcije protiv patogena. Osim što imaju ulogu u direktnoj obrani od napada patogena, istraživanja pokazuju kako ROS služe i kao signalne molekule u aktiviranju daljnje zaštite biljke domaćina koja, između ostalog, obuhvaća i akumulaciju fitoaleksina te aktivaciju gena uključenih u obranu biljke (Van Breusegem i sur. 2008).

Kako bi spriječile štetne učinke ROS-a biljke su razvile antioksidacijske obrambene mehanizme koji uključuju indukciju antioksidacijskih enzima. Alscher i sur. (2002) ističu kako se eliminacija ROS-a u biljnim stanicama odvija pomoću različitih komponenata enzimskog ili neenzimskog antioksidacijskog obrambenog sustava. Superoksidni ioni, nastali između ostalog i djelovanjem enzima NOX, podliježu reakciji dismutacije koju katalizira SOD, pri čemu nastaje H_2O_2 i akumulira se na mjestu napada (Takahashi i Asada 1983, Alscher i sur. 2002). Antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive bio je određen mjerenjem aktivnosti enzima katalaze (CAT), superoksid-dismutaze (SOD) i nespecifičnih gvajakol peroksidaza (GPOD). Treći dan nakon tretmana etanolom u obje *crypt*-linije aktivnosti svih triju antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GPOD) bile su

nepromijenjene nakon tretmana objema koncentracijama etanola u odnosu na kontrolno korijenje (Slika 29, 30, 31). Do prvih promjena u aktivnostima ovih enzima dolazi tjedan dana nakon indukcije gena *crypt* etanolom, i to uglavnom u linije O3. Tjedan dana nakon tretmana linije O3 etanolom, β -kriptogein uzrokuje povećanje specifične aktivnosti SOD, dok nakon dva tjedna povećava i specifičnu aktivnost SOD u korijenju linije O6. Unutarstanična koncentracija H_2O_2 regulirana je različitim enzimima, od kojih su najvažnije katalaze i nespecifične peroksidaze (Takahashi i Asada 1983, Alscher i sur. 2002). Dosadašnja istraživanja ukazuju na povećanje aktivnosti CAT nakon inokulacije biljke duhana pepelnicom (Lebeda i sur. 1999). U mojem istraživanju povećanje specifične aktivnosti CAT u transgenom korijenju pojavilo se nakon indukcije ekspresije β -kriptogeina 1%-tnim etanolom, u linije O3 nakon tjedan dana, a u linije O6 tek nakon dva tjedna. CAT je aktivna pri relativno visokim koncentracijama H_2O_2 , dok se niže koncentracije H_2O_2 uklanjaju pomoću GPOD (Gadjev i sur. 2008). Katalaze imaju važnu ulogu u uklanjanju većine H_2O_2 , međutim zbog visokog afiniteta za H_2O_2 i prisutnosti na različitim lokacijama unutar stanice, peroksidaze uklanjaju onaj H_2O_2 koji je CAT nedostupan (Van Breusegem i sur. 2001). Kao i u slučaju CAT, povećanje specifične aktivnosti GPOD u transgenom korijenju uzokovao je β -kriptogein induciran 1%-tnim etanolom, u obje *crypt*-linije tjedan dana nakon tretmana. Najveća aktivnost GPOD bila je zabilježena dva tjedna nakon indukcije gena *crypt* 1% -tnim etanolom, u obje linije transgenog korijenja. Povećanu aktivnost CAT i GPOD u linije O3 pratilo je sniženje razine H_2O_2 u tkivu. Nakon dva tjedna, tendencija sniženja H_2O_2 bila je zabilježena i u linije O6 iako nije statistički značajna. Ryals i sur. (1996) u svojem istraživanju pokazuju i važnost uloge peroksidaza u obrambenim odgovorima biljke na napad patogena. Važnost peroksidaza u obrani biljke ističu Hiraga i sur. (2001) koji u svojem istraživanju pokazuju kako se tijekom ranjavanja i infekcije patogenom u biljkama inducira nekoliko izoenzima GPOD. Tolerancija na stres usko je povezana s učinkom antioksidacijskih enzima, za koje je poznato da im se aktivnosti povećaju u uvjetima različitih stresnih čimbenika (Mittler 2002). Tijekom elicitacije kulture kosmatog korijenja ginsenga metil-jasmonatom, povećava se aktivnost antioksidacijskih enzima (SOD i GPOD) koji štite korijenje od oksidacijskog stresa (Ali i sur. 2005).

U mojem istraživanju utvrđeno je da inducibilna ekspresija gena *crypt* uzrokuje povećanje aktivnosti NOX te antioksidativnih enzima – SOD, CAT i GPOD u obje linije transgenog korijenja (O3 i O6). Povećana aktivnost antioksidativnih enzima regulira

količinu H₂O₂ u tkivu te sprječava lipidnu peroksidaciju tkiva. Veća koncentracija etanola rezultirala je jačim antioksidativnim odgovorom zbog jače ekspresije β -kriptogaina. Dobiveni rezultati imaju više značenja. Povećani antioksidacijski status transgenog korijenja, koje secernira povećane razine fenolnih spojeva u hranjivu podlogu, štiti kulturu kosmatog korijenja od oksidacijskog stresa kojeg može uzrokovati elicitacija endogeno sintetiziranim β -kriptogeinom, ali i drugi stresni čimbenici koji bi mogli predstavljati prijetnju tijekom uzgoja kulture u bioreaktorima (kao npr. sadržaj kisika). Osim toga, svojstvo genetičke elicitacije endogeno sintetiziranim β -kriptogeinom da povećava antioksidativni status biljne stanice može se iskoristiti za daljnja istraživanja koja vode ka dobivanju transgenih biljaka otpornih na biotički i druge okolišne stresne čimbenike. U posljednjih je nekoliko godina mnogo truda uloženo u identifikaciju potencijalnih ciljnih gena za upotrebu u genetičkom inženjerstvu, u svrhu razvijanja otpornosti na abiotički i biotički stres. Kako bi se povećala tolerancija na oksidativni stres, velik broj istraživanja je usmjeren prema dobivanju transgenih biljaka koje pojačano ekspimiraju različite antioksidacijske enzime (Lee i sur. 2007, Sun i sur. 2010). Kwon i sur. (2002) u svojem istraživanju ističu kako transgene biljke duhana kod kojih u kloroplastima dolazi do ekspresije CuZnSOD i askorbat peroksidaze (APX), pokazuju povišenu toleranciju na oksidativni stres induciran metil-viologenom (MV), herbicidom koji inducira stvaranje ROS-a. Nadalje, Lee i sur. (2007) u svojem su istraživanju dizajnirali transgene biljke duhana kako bi poboljšali toleranciju biljke na oksidativni stres. Njihovi rezultati jasno pokazuju kako se manipulacijom antioksidativnim mehanizmima u kloroplastima, biljne stanice mogu zaštititi od različitih stresnih čimbenika prisutnih u okolišu. Prema mojim rezultatima, genetičkom elicitacijom β -kriptogeinom postiže se povećanje ekspresije antioksidativnih enzima i u skladu s time dolazi do smanjenja oksidacijskog stresa. Inducibilna ekspresija gena *crypt* mogla bi biti dobra strategija u obrani biljaka od patogena i drugih okolišnih stresnih čimbenika. Nekoliko istraživanja opisuje transformaciju genom *crypt* s ciljem postizanja rezistencije na napad patogena. Ekspresija β -kriptogaina u duhanu je rezultirala rezistencijom duhana prema oomiceti *P. parasitica* var. *nicotianae*, ali i prema nekim drugim patogenima (Tepfer i sur. 1998, Keller i sur. 1999). Jiang i sur. (2004) su u svojim istraživanjima pokazali da ekspresija β -kriptogaina doprinosi povećanoj otpornosti transgenog duhana na različite patogene ali i povećanoj toleranciji na solni stres u odnosu na kontrolne biljke. Ta istraživanja pokazuju da ekspresija gena *crypt* štiti od patogena, a moji rezultati pokazuju da aktiviran antioksidacijski sustav štiti biljku od negativnog utjecaja ROS-a.

Proučavanje elicitora i njihovog djelovanja u različitim biljnim vrstama neophodno je kako bi se pronašle učinkovite strategije za smanjenje negativnog učinka oksidacijskog stresa u biljkama (Ceron-Garcia i sur. 2011). Izlaganje biljke jednoj vrsti stresnog čimbenika može potaknuti tolerantnost na drugi tip stresnog čimbenika (ili više njih). Mehanizmi otpornosti na različite vrste stresa imaju mnoge zajedničke značajke, a neki mehanizmi obrane kao npr. povećana aktivnost antioksidacijskih enzima zajednički su različitim vrstama stresa.

6. ZAKLJUČCI

- Učinak proteinskog produkta transgena *crypt* na sintezu fenolnih spojeva u tkivu ukrasne koprive predviđen je tretiranjem linije kosmatog korijenja OA4 rekombinantnim β -kriptogeinom koji je uzrokovao akumulaciju ukupnih topljivih fenola u tkivu te njihovu sekreciju u tekuću hranjivu podlogu.
- Stanice eksplantata ukrasne koprive uspješno su transformirane binarnim vektorom koji sadrži gen *crypt* (pBinSRNA-CRYPT) te je iz njih regeneriran velik broj linija transgenog korijenja, čija je transformacija potvrđena lančanom reakcijom polimerazom umnažanjem gena *crypt*.
- Ekspresija gena *crypt* u transgenom korijenju ukrasne koprive kontrolirana je etanolom te je razina ekspresije β -kriptogaina ovisila o koncentraciji primijenjenog etanola.
- Linija OA4 upotrijebljena je za testiranje učinka različitih koncentracija etanola *per se*. Etanol je utjecao na smanjenje rasta kosmatog korijenja ukrasne koprive kao i na propusnost plazma membrane, budući da je 2% -tni etanol doprinosa sekreciji RA i CAF.
- Na rast transgenog korijenja imali su utjecaj i etanol *per se* i β -kriptogein. Etanol je inhibirao rast korijenja, međutim, njegov negativni učinak umanjila je ekspresija gena *crypt*.
- Rezultati dobiveni bioinformatičkom analizom aminokiselinskog slijeda β -kriptogaina i SDS-PAGE analizom izvanstaničnih proteina ukazali su na vjerojatnost da se endogeno sintetiziran β -kriptogein izlučuje van stanice. Na temelju ranijih istraživanja poznato je da β -kriptogein ulazi u interakciju s receptorom na plazma membrani, elicitira obrambeni odgovor stanice i utječe na metabolizam sekundarnih metabolita kao i na oksidacijski/antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive.
- Inducibilna ekspresija gena *crypt* uzrokuje smanjenje sadržaja ukupnih topljivih fenola i RA u tkivu transgenog korijenja ukrasne koprive i povećani sadržaj ukupnih topljivih fenola, RA i CAF u tekućoj hranjivoj podlozi transgenog

korijenja ukrasne koprive, što upućuje na značajnu ulogu β -kriptogaina u stimulaciji sekrecije fenolnih spojeva, koja je kontrolirana razinom ekspresije β -kriptogaina. Stoga bi se β -kriptogein potencijalno mogao koristiti za regulaciju sekrecije značajnih sekundarnih metabolita.

- Niže količine topljivih i netopljivih fenola stanične stijenke u *crypt*-linijama tretiranim etanolom, uočene mjerenjem intenziteta autofluorescencije, također su posljedica sekrecije fenola van stanice, odnosno posljedica ekspresije gena *crypt*.
- Mjerenje pokazatelja oksidacijskog stresa (H_2O_2 i MDA) pokazalo je kako elicitacija endogeno sintetiziranim β -kriptogeinom ne uzrokuje oštećenja koja mogu nastati uslijed oksidacijskog stresa, tj. potvrđena je odsutnost oksidacijskog stresa u transgenom korijenju ukrasne koprive.
- Inducibilna ekspresija β -kriptogaina uzrokuje povećanje aktivnosti NOX i antioksidacijskih enzima – SOD, CAT i GPOD u dvije istraživane linije transgenog korijenja (O3 i O6), što upućuje na značajnu ulogu endogeno sintetiziranog β -kriptogaina u povećanju antioksidativnog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive. Stoga bi inducibilna ekspresija gena *crypt* mogla biti dobra strategija u obrani biljaka od patogena i drugih okolišnih stresnih čimbenika.
- Povećana aktivnost antioksidacijskih enzima u transgenom korijenju ukrasne koprive regulira količinu H_2O_2 u tkivu te sprječava lipidnu peroksidaciju tkiva. Veća koncentracija etanola rezultirala je većim antioksidativnim odgovorom zbog jače indukcije ekspresije gena *crypt*.
- Povećani antioksidacijski status transgenog korijenja štiti kulturu kosmatog korijenja od oksidacijskog stresa kojeg može uzrokovati elicitacija endogeno sintetiziranim β -kriptogeinom, ali i drugi stresni čimbenici koji bi mogli predstavljati prijetnju tijekom uzgoja kulture u bioreaktorima.
- Istraživanje učinka gena *crypt* iz oomicete unešenog u biljni genom doprinosi procjeni mogućnosti upotrebe transgena koji kodiraju elicitore za poticanje

biosinteze i izlučivanja značajnih sekundarnih metabolita te ukazuje na mogućnost unaprijeđenja biotehnološke proizvodnje ružmarinske i kavene kiseline.

7. LITERATURA

Aebi H (1984) Catalase *in vitro*. Method Enzymol 105:121–126.

Ali MB, Yu K-W, Hahn E-J, Paek K-Y (2005) Differential responses of anti-oxidants enzymes, lipoxygenase activity, ascorbate content and the production of saponins in tissue cultured root of mountain *Panax ginseng* C.A. Mayer and *Panax quinquefolium* L. in bioreactor subjected to methyl jasmonate stress. Plant Sci 169:83–92.

Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. J Exp Bot 53:1331–1341.

Amelot N, Carrouche A, Danoun S, Bourque S, Haiech J, Pugin A, Ranjeva R, Grima-Pettenati J, Mazars C, Briere C (2011) Cryptogein, a fungal elicitor, remodels the phenylpropanoid metabolism of tobacco cell suspension cultures in a calcium-dependent manner. Plant Cell Environ 34:149–161.

Ashraf M (2009) Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnol Adv 27: 84–93.

Askerlund P, Larsson C, Widell S, Moller IM (1987) NAD(P)H oxidase and peroxidase activities in purified plasma membranes from cauliflower inflorescences. Physiol Plant 71:9–19.

Auh C-K, Murphy TM (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of $O_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. Plant Physiol 107:1241-1247.

Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM (2002) Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiol Biochem 40: 983–995.

Basse CW, Fath A, Boller T (1993) High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. J Biol Chem 268:14724–14731.

Bauer N, Fulgosi H, Jelaska S (2011) Overexpression of Phenylalanine Ammonia-Lyase in Transgenic Roots of *Coleus blumei* Alters Growth and Rosmarinic Acid Synthesis. Food Technol Biotechnol 49:24–31.

- Bauer N, Kiseljak D, Jelaska S (2009) The effect of yeast extract and methyl jasmonate on rosmarinic acid accumulation in *Coleus blumei* hairy roots. *Biolog Plant* 53:650–656.
- Bauer N, Leljak-Levanic D, Mihaljevic S, Jelaska S (2002) Genetic transformation of *Coleus blumei* Benth. using *Agrobacterium*. *Food Technol Biotechnol* 40:163–169.
- Bektas T (2008) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol* 99:1584-1588.
- Benhamou N (1996) Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Sci* 1:233–240.
- Berlin J, Ruegenhagen C, Dietze P, Fecker LF, Goddijn OJM, Hoge JHC (1993) Increased production of serotonin by suspension and root cultures of *Peganum harmala* transformed with a tryptophan decarboxylase cDNA clone from *Catharanthus roseus*. *Transgenic Res* 2:336–344.
- Bhattacharjee S (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr Sci* 89:1113–1121.
- Binet MN, Humbert C, Lecourieux D, Vantard M, Pugin A (2001) Disruption of 14 microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive 15 response in tobacco cells. *Plant Physiol* 125:564–572.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99.
- Brodelius P, Pedersen H (1993) Increasing secondary metabolite production in plant cell culture by redirecting transport. *Trends Biotechnol* 11:30–36.
- Boissy G, de la Fortelle E, Kahn R, Huet JC, Bridogne G, Pernollet JC, Brunie S (1996) Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. *Structure* 4:1429–1439.
- Boitel-Conti M, Gontier E, Laberche JC, Ducrocq C, Sangvan-Norreel BS (1996) Inducer effect of Tween 20 permeabilization treatment used for release of stored alkaloids in *Datura innoxia* Mill. hairy root cultures. *Plant Cell Rep* 16:241–244.

Bolwell GP, Wojtaszek P (1997) Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defence - a broad perspective. *Physiol Mol Plant Pathol* 51:347–366.

Bonnet P, Bourdon E, Ponchet M, Blein JP, Ricci P (1996) Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur J Plant Pathol* 102:181–192.

Bottin A, Veronesi C, Pontier D, Esquerré-Tugayé M-T, Blein J-P, Rusterucci C, Ricci P (1994) Differential responses of tobacco cells to elicitors from *Phytophthora* species. *Plant Physiol Biochem* 32:373-378.

Bowell PG, Bindschedler LV, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C, Minibayeva F. 2001. The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* 53:1367-1376.

Bourque S, Binet M-N, Ponchet M, Pugin A, Lebrun-Garcia A (1999) Characterization of the cryptogin binding sites on plant plasma membranes. *J Biol Chem* 274:34699–34705.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

Braugher JM, Hall ED (1989) Central nervous system trauma and stroke. I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 6:289–301.

Cai Z, Kastell A, Knorr D, Smetanska I (2012) Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep* 31:461–477.

Canel C, Lopes-Cardoso MI, Whitmer S, Van der Fits L, Pasquali G, Van der Heijden R, Hoge JH, Verpoorte R (1998) Effect of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta* 205:414–419.

Ceron-Garcia A, Gonzalez-Aguilar GA, Vargas-Arispuro I, Islas-Osuna MA, Martinez-Tellez MA (2011) Oligoglucans as Elicitors of an Enzymatic Antioxidant System in

Zucchini Squash (*Cucurbita pepo* L.) Seedlings at Low Temperature. *Am J Agr Biol Sci* 6:52–61.

Chao PC, Hsu CC, Yin MC (2009) Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. *Nutr Metab (Lond)* 6:33.

Chaudhuri KN, Ghosh B, Tepfer D, Jha S (2005) Genetic transformation of *Tylophora indica* with *Agrobacterium rhizogenes* A4: growth and tylophorine productivity in different transformed root clones. *Plant Cell Rep* 24:25–35.

Chaudhuri K, Das S, Bandyopadhyay M, Zalar A, Kollmann A, Jha S, Tepfer D (2009) Transgenic mimicry of pathogen attack stimulates growth and secondary metabolite accumulation. *Transgenic Res* 18:121–134.

Chen H, Chen F (2000) Effects of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of a high-tanshinone-producing line of the Ti transformed *Salvia miltiorrhiza* cells in suspension culture. *Process Biochem* 35:837-840.

Chen H, Chena F, Chiu FC, Lo CM (2001) The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzyme Microb Technol* 28:100–105.

Chilton MD, Drummond MH, Merio DJ, Sciaky D, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11:263-271.

Chilton MD, Saiki RK, Yadav N, Gordon MP, Quetier F (1980) T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA of crown gall tumour cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:4060–4064.

Chilton MD, Tepfer DA, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempé J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* 295:432–434.

Choi PS, Kim YD, Chung HJ, Choi DW, Liu JR (2004) Plant regeneration from hairy-root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep* 22:828–831.

Chung T-W, Moon S-K, Chang Y-C, Ko J-H, Y-C Lee, Cho G, Kim S-H, Kim J-G, Kim C-H (2004) Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 18:1670–1681.

Clifford MN (2001) The health effects of tea and tea components. Appendix 1. A nomenclature for phenols with special reference to tea. *Crit Rev Food Sci Nutr* 41:393–397.

Crane C, Wright E, Dixon RA, Wang Z-Y (2006) Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed root and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* 223:1344–1354.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000) In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (ur), *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 1250–1318.

Dai J, Mumper RJ (2010) Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 15:7313–7352.

Deepak SA, Ishii H, Park P (2006) Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming/scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. *Physiol Mol Plant Pathol* 69:1–3.

Diaz J, Bernal A, Pomar F, Merino F (2001) Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. *Plant Sci* 161:179–188.

Di Cagno R, Guidi L, De Gara L, Soldatini GF (2001) Combined cadmium and ozone treatments affects photosynthesis and ascorbate dependent defences in sunflower. *New Phytol* 151:627–636.

Dilorio AA, Weathers PJ, Cheetham RD (1993) Non-lethal secondary product release from transformed root cultures of *Beta vulgaris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 39:174–180.

Dixon R, Paiva NL (2004) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085–1995.

Donghua J, Zejian G, Xujun C, Zhiqiang C, Zhong Z (2004) Study on tobacco disease resistances mediated by the elicitor gene cryptogein from *Phytophthora cryptogea*. Chin J Agr Biotechnol 1:125–131.

Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. Plant Physiol 121:163–172.

Duke JA, Godwin MJ, Cellier DUJ, Duke PAK (2002) Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, USA, pp 210–215.

Ebel J, Cosio EG (1994) Elicitors of plant defense responses. Int Rev Cytol 148:1–36.

Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell EJ, Steffen KL (eds) Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp 13–25.

Engels C, Neumann G, Gahoonia TS, George E, Schenk M (2000) Assessing the ability of roots for nutrient acquisition. In: Schmidt AL (ed) Root methods. Springer, Berlin, pp 403–459.

Feher J, Csomos G, Vereckei A (1987) Free radical reactions in medicine. Springer-Verlag, Berlin.

Felenbok B (1991) The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the *alcA-alcR* system as a tool for the expression of recombinant proteins. J Biotechnol 17:11–17.

Filichkin SA, Meilan R, Busov VB, Ma C, Brunner AM, Strauss SH (2006) Alcohol-inducible gene expression in transgenic *Populus*. Plant Cell Rep 25:660–667.

Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vargas VM (1999) 'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends Plant Sci 4: 220–226.

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. Physiol Plantarum 100:241–254.

Fraga CG (ed) (2010) Plant phenolics and human health – Biochemistry, nutrition, and pharmacology. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey.

Fründt C, Meyer AD, Ichikawa T, Meins F (1998) A tobacco homologue of the Ri-plasmid *orf13* gene causes cell proliferation in carrot root discs. *Mol Gen Genet* 259:559–568.

Furtado MA, de Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC (2008) Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mut Res* 657:150–154.

Gadjev I, Stone JM, Gechev TS (2008) Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *Int Rev Cell Mol Biol* 270:87–144.

von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF (1997) Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT and BHA. *J Agric Food Chem* 45:632–638.

Gara LD, Pinto MC, Tommasi F (2003) The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant–pathogen interaction. *Plant Physiol Bioch* 41:863–870.

Garcia-Brugger AG, Lamotte O, Vandelle E, Bourque S, Lecourieux D, Poinssot B, Wendehenne D, Pugin A (2006) Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Mol Plant Microbe Interact* 19:711–724.

Garooi GA, Salter MG, Caddick, MX, Tomsett AB (2005) Characterization of the ethanol-inducible *alc* gene expression system in tomato. *J Exp Bot* 56:1635–1642.

Gaspar T, Penel C, Hagege D, Grepin H (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. In: Lobarzewski J, Grepin H, Penel C, Gaspar T (eds) Biochemical molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Univ M Currie-Sklodowska, Lublin, , Univ of Geneve, Geneva, pp 249–280.

Georgiev MI, Kuzeva SL, Pavlov AI, Kovacheva EG, Ilieva MP (2007b) Elicitation of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension culture with abiotic elicitors. *World J Microbiol Biotechnol* 23:301–304.

Georgiev MI, Pavlov AI, Bley T (2007a) Hairy root type plant in vitro systems as sources of bioactive substances. *World J Microbiol Biotechnol* 74:1175–1185.

Göbel C, Feussner I, Roshal S (2003) Lipid peroxidation during the hypersensitive response in Potato in the absence of 9-Lipoxygenases. *J Biol Chem* 278:52834–52840.

Giannopolitis CN, Ries SK (1977) Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol* 59:309–314.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 48:909–930.

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* 23:441–450.

Grzegorzczak I, Krolicka A, Wysokinska H (2006) Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Z Naturforsch* 61:351–356.

Gülcin I (2006) Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217:213–220.

Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *P Natl Acad Sci USA* 90:1629–1633.

Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40:347–369.

Halliwell B (1996) Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Rad Res* 25:57–74.

Hanania U, Avni A (1997) High affinity binding site for ethylene inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J* 12:113–120.

Hammond-Kosack KE, Harrison K, Jones JDG (1994) Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene *Avr9* in tomato seedlings carrying the disease resistance gene *Cf-9*. *Proc Natl Acad Sci* 91:10445–10449.

Harborne JB (1998) Phenolic compounds. In: Harborne JB (ed) *Phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall, London pp 40–106.

-
- Hashimoto T, Yun DJ, Yamada Y (1993) Production of tropane alkaloids in genetically engineered root cultures. *Phytochemistry* 32:713–718.
- Haslam E (1998) Practical polyphenolics. From structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge University Press, Cambridge.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198.
- Heyon KJI, Yoo YJE (2002) Optimization of SOD biosynthesis by controlling sucrose concentration in the culture of carrot hairy root. *J Microbiol Biotechnol* 12:617–621.
- Heut JC, Le Caer JP, Nespoulous C, Pernollet JC (1995) The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Mol Plant Microbe Interact* 8:302–310.
- Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol* 42:462–468.
- Ikeda K, Tsujimoto K, Uozaki M, Nishide M, Suzuki Y, Koyama AH, Yamasaki H (2011) Inhibition of multiplication of herpes simplex virus by caffeic acid. *Int J Mol Med* 28:595–598.
- Iwahashi H, Ishii L, Sugata R, Kido R (1990) The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride, and hydrogen peroxide. *Arch Biochem Biophys* 276:242–247.
- Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH (2004) Studies on the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. *Phytomedicine* 11:424–430.
- Jiang D, Chen X, Wu K, Guo Z (2004) Expression of Cryptogein in tobacco plants exhibits enhanced disease resistance and tolerance to salt stress. *Chinese Sci Bull* 49:803–809.
- Jiang RW, Lau KM, Hona PM, Mak TCW, Woo KS, Fung KP (2005) Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr Med Chem* 12:237–246.

Jouanin L (1984) Restriction map of an agropine-type Ri plasmid and its homologies to Ti plasmids. *Plasmid* 12: 91–102.

Jwa N, Agrawal GK, Tamogami S, Yonekura M, Han O, Iwahashi H, Rakwal R (2006) Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiol and Biochem* 44:261–273.

Kamoun S, Klucher KM, Coffey MD, Tyler BM (1993) gene encoding a host-specific elicitor protein of *Phytophthora parasitica*. *Mol Plant Microbe Interact* 6:573–581.

Kastell A, Cai Z, Mewis I, Smetanska I (2011) Improved production of glucosinolates by jasmonic acid and tryptophan in brassica hairy roots and exudates. World Congress on Biotechnology, Hyderabad.

Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricci P (1999) Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. *Plant Cell* 11:223–236.

Keller T, Damude HG, Werner D, Doemer P, Dixon RA, Lamb C (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *Plant Cell* 2:255–266.

Keuls M (1952) The use of the “studentized range” in connection with an analysis of variance. *Euphytica* 1:112–122.

Khan BA, Akhtar N, Anwar M, Mahmood T, Khan H, Hussain I, Khan KA (2012) Botanical Description of *Coleus forskohlii*: A Review. *J Med Plants Res* 6:4832–4835.

Khattak MMAK, Taher M (2011) Bioactivity-guided isolation of antimicrobial agent from *Coleus amboinicus* Lour (Torbangun). Technical Report. Submitted IIUM RMC.

Khory NR, Katrak NN (1999) *Materia medica of India and their therapeutics*. BDH Printers, New Delhi, p 380.

Kiddle GA, Doughty KJ, Wallsgrove RM (1994) Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves. *J Exp Bot* 45:1343–1346.

Kieffer F, Lherminier J, Simon-Plas F, Nicole M, Payot M, Elmayan T, Blein JP (2000) The fungal elicitor cryptogein induces cell wall modifications on tobacco cell suspension. *J Exp Bot* 51:1799–1811.

Kim JH, Yu J, Mahoney N, Chan KL, Molyneux RJ, Varga J, Bhatnagar D, Cleveland TE, Nierman WC, Campbell BC (2008) Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol* 122:49–60.

Kim YH, Yoo YJ (1996) Peroxidase production from carrot hairy root cell culture. *Enzyme Microb Technol* 18:531–535.

Kumaran A, Karunakaran RJ (2007) Activity guided isolation and identification of free radical - scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chem* 100:356–361.

Kuzma L, Bruchajzer E, Wysokinska H (2009) Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor. *Enzyme Microb Technol* 44:406–410.

Kwon SY, Jeong YJ, Lee HS, Kim JS, Cho KY, Allen RD, Kwak SS (2002) Enhanced tolerances of transgenic tobacco plants expressing both superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in chloroplasts against methyl viologen-mediated oxidative stress. *Plant Cell Environ* 25:873–882.

Lafay S, Gil-Izquierdo A (2008) Bioavailability of phenolic acids. *Phytochem Rev* 7:301–311.

Lebeda A, Jancová D, Luhová L (1999) Enzymes in fungal plant pathogenesis. *Phyton* 39:51–56.

Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in Bright Yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* 146:1255–1266.

Lebrun-Garcia A, Ouaked F, Chiltz A, Pugin A (1998) Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco Cells *Plant J* 15:773–781.

Lee L-Y, Gelvin SB (2008) T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol* 146:325–332.

Lee SY, Lee CY, Eom SH, Kim YK, Park NI, Park SU (2010) Rosmarinic acid production from transformed root cultures of *Nepeta cataria* L. *Sci Res Essays* 5:1122–1126.

Lee SY, Xu H, Kim YK, Park SU (2008) Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *World J Microbiol Biotechnol* 24:969–972.

Lee YP, Kim SH, Bang JW, Lee HS, Kwak SS, Kwon SY (2007) Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts. *Plant Cell Rep* 26: 591–598.

Li M, Peebles CAM, Shanks JV, San K-Y (2011) Effect of sodium nitroprusside on growth and terpenoid indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy root cultures. *Biotechnol Prog* 27:625–630.

Li W, Koike K, Asada Y, Yoshikawa T, Nikaido T (2005) Rosmarinic acid production by *Coleus forskohlii* hairy root cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 80:151–155.

Majumdar S, Garai S, Jha S (2012) Use of the cryptogein gene to stimulate the accumulation of bacopa saponins in transgenic *Bacopa monnieri* plants. *Plant Cell Rep* 31:1899–1909.

Mandal SM, Chakraborty D, Dey S (2010) Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signal Behav* 5:359–368.

Medina-Bolivar F, Condori J, Rimando AM, Hubstenberger J, Shelton K, O'Keefe SF, Bennett S, Dolan MC (2007) Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry* 68:1992–2003.

Menke FLH, Parchmann S, Mueller MJ, Kijme JW, Memelink J (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 119:1289–1296.

- Middleton E, Kandaswami C (1994) The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB (ed) *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London pp 619–652.
- Mikes V, Milat ML, Ponchet M, Ricci P, Blein JP (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett* 416:190–192.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 7:405–410.
- Mishra S, Jha AB, Dubey RS (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* 248:565–577.
- Morton JF (1992) Country borage (*Coleus amboinicus* Lour.), a potent flavouring and medicinal plant. *J Herbs Spices Med Plants* 1:55–56.
- Mukherjee SP, Choudhuri MA (1983) Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in *Vigna* seedlings. *Physiol Plantarum* 58:166–170.
- Murakami Y, Omoto T, Asai I, Shimomura K, Yoshihira K, Ishimaru K (1998) Rosmarinic acid and related phenolics in transformed root cultures of *Hyssopus officinalis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 53:75–78.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Nedeloska TV, Doran PM (2000) Hyperaccumulation of cadmium by hairy roots of *Thlapsi caerulescens*. *Biotechnol Bioeng* 67:607–615.
- Newman D (1939) The distribution of range in samples from a normal population, expressed in terms of an independent estimate of standard deviation. *Biometrika* 31:20–30.
- Nilsson O, Olsson O (1997) Getting to root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes rol* genes in the formation of transformed roots. *Physiol Plant* 100:463–473.

- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:249–279.
- Nychas G-J (1995) Natural antimicrobials from plants. In: Gould GW (ed) *New methods of food preservation*. Blackie Academic & Professional, London, (pp. 58–89).
- Nürnbergger T (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell Mol Life Sci* 55:167–182.
- Odjacova M, Hadjiivanova C (2001) The complexity of pathogen defense in plants. *Bulg J Plant Physiol* 27:101–109.
- O'Donohue M, Gousseau H, Huet JC, Tepfer D, Pernollet JC (1995) Chemical synthesis, expression and mutagenesis of a gene encoding β -cryptogein, an elicitor produced by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Mol Biol* 27:577–586.
- O'Donohue MJ, Boissy G, Huet JC, Nespoulous C, Brunie S, Pernollet JC (1996) Overexpression in *Phichia pastoris* and crystallization of an elicitor protein secreted by the phytopathogenic fungus, *Phytophthora cryptogea*. *Protein Expr Purif* 8:254–261.
- Ong HC, Norzalina J (1999) Malay herbal medicine in Gemencheh, Negri Sembilan, Malaysia. *Fitoterapia* 70:10–14.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Sanbongi C, Kato Y, Osawa T, Yoshikawa T (2002) Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN)-sensitized mice. *Free Radic Biol Med* 33:798–806.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T (2004) Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 25:549–557.
- Prajapati ND, Purohit SS, Sharma AK, Kumar T (2003). *A Handbook of Medicinal Plants*. Agrobios Publishers, India, p 162.
- Panabières F, Birch PRJ, Unkles SE, Ponchet M, Lacourt I, Venard P, Keller H, Allasia V, Ricci P, Duncan JM (1998) Heterologous expression of a basic elicitor from *Phytophthora*

cryptogea in *Phytophthora infestans* increases its ability to cause leaf necrosis in tobacco. Microbiology 144:3343-3349.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C (2005) Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. Plant Cell Rep 24: 255–265.

Peever TL, Higgins VJ (1989) Electrolyte leakage, lipoxygenase, and lipid peroxidation induced in tomato leaf tissue by specific and nonspecific elicitors from *Cladosporium fulvum*. Plant Physiology 90:867–875.

Peng M, Kuc J (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. Phytopathology 82:696–699.

Petersen M, (1997) Cytochrome P-450-dependent hydroxylation in the biosynthesis of rosmarinic acid in *Coleus*. Phytochemistry 45:1165–1172.

Petersen M, Simmonds MSJ (2003) Molecules of interest: rosmarinic acid. Phytochemistry 62:121–125.

Petersen M, Häusler E, Karwatzki B, Meinhard J (1993) Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in cell cultures of *Coleus blumei*. Planta 189:10–14.

Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nature Methods 8:785–786.

Poli G, Parola M (1997) Oxidative damage and fibrogenesis. Free Rad Biol Med 22:287–305.

Ponchet M, Panabières F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Triantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? Cell Mol Life Sci 56:1020–1047.

Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I (2006) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. Trends Plant Sci 12:29–36.

Pugin A, Frachisse JM, Tavernier E, Bligny R, Gout E, Douce R, Guern J (1997) Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: involvement of a plasma

membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9:2077–2091.

Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Nisimoto Y, Yoshino M (2005) Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. *Free Radical Res* 39:995–1003.

Quiroga M, Guerrero C, Botella MA, Barceló A, Amaya I, Medina MI, Alonso FJ, de Forchetti SM, Tigier H, Valpuesta V (2000) A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol* 122:1119–1128.

Rasineni GK, Siddavattam D, Reddy AR (2008) Free radical quenching activity and polyphenols in three species of *Coleus*. *J Med Plants Res* 2:285–291.

Ray S, Ghosh B, Sen S, Jha S (1996) Withanolide production by root cultures of *Withania somnifera* transformed with *Agrobacterium rhizogenes*. *Planta Med* 62:571–573.

Radman R, Saez, T, Bucke C, Keshavarz T (2003) Elicitacion of plant and microbial cell systems. *Biotechnol Appl Bioc* 37:91–102.

Ralph J, Quideau S, Grabber JH, Hatfield RD (1994) Identification and synthesis of new ferulic acid dehydrodimers present in grass cell-walls. *J Chem Soc Perkin Trans* 1:3485–3498.

Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 183:555–563.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2:152–159.

Robbins RJ (2003) Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem* 51:2866–2887.

de la Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Gonzalez-Aguilar GA (2010) Fruit and vegetable phytochemicals - Chemistry, nutritional value, and stability. Wiley-Blackwell, Ames.

Roslan HA, Salter MG, Wood CD, White MD, Croft KP, Robson F, Coupland G, Doonan J, Laufs P, Tomsett AB, Caddick MX (2001) Characterisation of the ethanol-inducible alc gene expression system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 28:225–235.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8:1809–1819.

Ryan D, Robards K, Prenzler P, Antolovich M (1999) Applications of mass spectrometry to plant phenols. *Trend Anal Chem* 18:362–372.

Russell WR, Burkitt MJ, Provan GJ, Chesson A (1999a) Structure specific functionality of plant cell wall hydroxycinnamates. *J Sci Food Agric* 79:408–410.

Russell WR, Hanley AB, Burkitt MJ, Chesson A (1999b) Effect of substitution on the 2+2 cycloaddition reaction of phenylpropanoids. *Bioorg Chem* 27:339–350.

Rustérucci C, Stallaert V, Milat ML, Pugin A, Ricci P, and Blein JP (1996) Relationship between AOS, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* 111:885–891.

Rustérucci C, Montillet JL, Agnel JP, Battesti C, Alonso B, Knoll A, Bessoule JJ, Etienne P, Suty L, Blein JP, Triantaphylidès C (1999) Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin on tobacco leaves. *J Biol Chem* 274:36446–36455.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K (2011) *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid *Int J Pharm* 403:136–138.

Scarpati ML, Oriente G (1958) Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus* off.). *Ric Sci* 28:2329–2333.

Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101:7–12.

Sevon N, Oksman-Caldentey K-M (2002) *Agrobacterium rhizogenes* - mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Planta Med* 68:859–868.

Shanks JV, Morgan J (1999) Plant “hairy root” culture. *Curr Opin Biotechnol* 10:151–155.

Sharma P, Dubey RS (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul* 46:209–221.

Sharp JM, Doran PM (2001) Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Prog* 17:979–992.

Siegel BZ, Galston W (1967) The peroxidase of *Pisum sativum*. *Plant Physiol* 42:221–226.

Sies H (1985) *Oxidative stress*. Academic press, Orlando.

Simon-Plas F, Elmayan T, Blein JP (2002) The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells. *Plant J* 31:137–147.

Simon-Plas F, Rustérucchi C, Milat ML, Humbert C, Montillet JL, Blein JP (1997) Active oxygen species production in tobacco cells elicited by cryptogein. *Plant Cell Environ* 20:1573–1579.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: Lester P (ed) *Methods in Enzymology: Oxidants and Antioxidants Part A*, Vol 299, Academic Press, San Diego pp 152-178.

Ślesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* 54:39–50.

Slightom JL, Durand-Tardif M, Jouanin L, Tepfer D (1986) Nucleotide sequence analysis of the TL-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. *J Biol Chem* 261:108–121.

Smetanska I (2008) Production of secondary metabolites using plant cell cultures. *Food Biotechnol* 111:187–228.

Stallaert VM, Ducret JM, Tavernier E, Blein JP (1995) Lipid peroxidation in tobacco leaves treated with elicitor cryptogein: evaluation by high temperatures thermoluminescence emission and chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 1229:290–295.

Stalikas CD (2007) Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *J Sep Sci* 30:3268–3295.

Staniforth V, Chiu LT, Yang NS (2006) Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. *Carcinogenesis* 27:1803–1811.

Sun WH, Duan M, Li F, Shu DF, Yang S, Meng QW (2010) Overexpression of tomato *tAPX* gene in tobacco improves tolerance to high or low temperature stress. *Biol Plantarum* 54:614–620.

Swarup V, Ghosh J, Ghosh S, Saxena A, Basu A (2007) Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrob Agents Chemoter* 51:3367–3370.

Szabo E, Thelen A, Petersen M (1999) Fungal elicitor preparations and methyl jasmonate enhance rosmarinic acid accumulation in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Rep* 18:485–489.

Tada H, Murakami Y, Omoto T, Shimomura K, Ishimaru K (1996) Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry* 42:431–434.

Takahashi M, Asada K (1983) Superoxide anion permeability of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. *Arch Biochem Biophys* 226:558–566.

Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T (2002) Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol* 449:261–267.

Tavernier E, Wendehenne D, Blein JP, Pugin A (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol* 109:1025–1031.

Tempe J (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts TDNA into the genomes of the host plants root cells. *Nature* 295: 432–434.

Tenhaken R, Levine A, Brisson LF, Dixon RA, Lamb C (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4158–4163.

Tepe B (2008) Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresour Technol* 99:1584–1588.

Tepfer D, Boutteaux C, Vigon C, Aymes S, Perez, V, O'Donohue MJ, Huet JC, Pernollet JC (1998) Phytophthora resistance through production of a fungal protein elicitor (*B*-cryptogein) in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 11:64–67.

Tercé-Laforgue T, Huet JC, Pernollet JC (1992) Biosynthesis and secretion of cryptogein, a protein elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*. *Plant Physiol* 98:936–941.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *Plant J* 11:1187–1194.

Toda S, Kumura M, Ohnishi M (1991) Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med* 57:8–10.

Torres MA, Dangl JL, Jones JDG (2002) Arabidopsis gp91 (phox) homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:517–522.

Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141:373–378.

Van Breusegem F, Bailey-Serres J, Mittler R (2008) Unraveling the tapestry of networks involving reactive oxygen species in plants. *Plant Physiol* 147:978–984.

Van Breusegem F, Vranova E, Dat JF, Inze D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci* 161:405–414.

Verma S, Dubey RS (2003) Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645–655.

Vermerris W, Nicholson R (2008) Phenolic compound biochemistry. Springer, Dordrecht.

Viard MP, Martin F, Pugin A, Ricci P, Blein JP (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* 104:1245–1249.

Watson B, Currier TC, Gordon MD, Chilton MD, Nester EW (1975) Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol 123:255–264.

Weising K, Kahl G (1996) Natural genetic engineering of plant cells: the molecular biology of crown gall and hairy root disease. World J Microbiol Biotechnol 2:327–351.

White PJ, Broadley M (2003) Calcium in plants. Ann Bot 92:487–511.

White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985) Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. J Bacteriol 164:33–44.

Widmer TL, Laurent N (2006) Plant extracts containing caffeic acid and rosmarinic acid inhibit zoospore germination of *Phytophthora* spp. pathogenic to *Theobroma cacao*. Eur J Plant Pathol 115:377–388.

Willkenes H, Inzé D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. Mol Breeding 1:207–228.

Wojatzek P (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem J 322:681–692.

Xiao Y, Zhang L, Gao S, Saechao S, Di P, Chen J, Chen W (2011) The *c4h*, *tat*, *hppr* and *hppd* genes prompted engineering of rosmarinic acid biosynthetic pathway in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. PLoS ONE 6: e29713. doi:10.1371/journal.pone.0029713.

Yahaya A, Khattak MMAK, Abd Rehman S, Damanik MRM, Abu Bakar I (2010) Antimicrobial Activities of some *Coleus* species (*Coleus amboinicus* and *Coleus blumei*). IIUM Research, Innovation & Invention Exhibition, Kuala Lumpur.

Yan Q, Shi M, Ng J, Wu JY (2006) Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. Plant Sci 170:853–858.

Yu LM (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. Proc Natl Acad Sci USA 92:4088–4094.

Zhao J, Davis LT, Verpoort R (2005) Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 23:283–333.

Zhao J, Hu Q, Guo YQ, Zhu WH (2001) Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca^{2+} -influx and the oxidative burst. *Plant Sci* 161:423–431.

Zhao J, Zheng SH, Fujita K, Sakai K (2004) Jasmonate and ethylene signaling and their interaction are integral parts of the elicitor signaling pathway leading to thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell culture. *J Exp Bot* 55:1003–1012.

Zhang HC, Liu JM, Chen HM, Gao CC, Lu HY, Zhou H, Li Y, Gao SL (2011) Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by Tween 80 in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Mol Biotechnol* 47:50–56.

Internet stranice korištene u pisanju doktorskog rada:

Web 1: www.icsn.cnrs-gif.fr, prisupljeno 20.12. 2012.

Web 2: www.multiloc.org/YLoc, pristupljeno 14.9.2012.

Web 3: www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/, pristupljeno 14.9.2012.

Web 4: wolfpsort.org/, pristupljeno 14.9.2012.

Web 5: abi.inf.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/, pristupljeno 14.9.2012.

Web 6: www.cbs.dtu.dk/services/SignalP, pristupljeno 14.9.2012.

8. SAŽETAK

Ukrasna kopriva (*Coleus blumei* Benth.) je zbog velikog sadržaja fenolnih spojeva poznata i kao ljekovita biljka. Zbog učinka koji fenolni spojevi imaju na očuvanje zdravlja čovjeka, u posljednjih se nekoliko godina interes javnosti i znanosti za fenolne spojeve znatno povećao. Zahvaljujući velikom farmakološkom značaju fenolnih spojeva različite su metode testirane kako bi se povećala njihova sinteza i istražila njihova fiziološka uloga. Svojstvo biotičkih elicitora da induciraju obrambeni odgovor biljke koristi se u kulturi *in vitro* kao strategija za povećanje proizvodnje komercijalno važnih spojeva. Osim toga, tretmani biotičkim elicitorima se često koriste i za povećanje otpornosti biljaka na patogene ali i na druge okolišne čimbenike. Jedan od najranijih obrambenih odgovora biljke uslijed napada patogena (odnosno tretmana elicitorima) predstavlja sinteza reaktivnih kisikovih jedinki (ROS). Međutim, uslijed nakupljanja ROS-a u stanicama može doći do oksidacijskog stresa. Kako bi spriječile štetne učinke ROS-a, biljke su razvile antioksidacijske obrambene mehanizme koji, između ostalog, uključuju i indukciju antioksidacijskih enzima. Beta-kriptogein je oomicetalni elicitor proteinske građe koji u biljaka izaziva hipersenzitivni odgovor i sustavno stjecanje otpornosti. Cilj je ovog rada bio uzgojiti transgeno korijenje ukrasne koprive, u kojem se gen *crypt* nalazi pod kontrolom inducibilnog promotora reguliranog alkoholom te na taj način kontroliranom sintezom β -kriptogaina u korijenju oponašati napad patogena. Ispitivan je učinak endogeno sintetiziranog β -kriptogaina na sintezu fenolnih spojeva i na antioksidacijski status transgenog korijenja ukrasne koprive. Transformacija ukrasne koprive učinjena je pomoću bakterije *A. rhizogenes* soja A4, koja sadrži binarni vektor pBinSRNA-CRYPT. Uspješnost transformacije potvrđena je lančanom reakcijom polimerazom (PCR), umnažanjem odsječka gena *crypt* i gena *orf13*. Za provođenje pokusa odabrane su tri linije transgenog korijenja ukrasne koprive (O3, O5, O6). Linija OA4 (bez gena *crypt*) upotrijebljena je za testiranje učinka različitih koncentracija etanola *per se* na indeks rasta, sadržaj ukupnih topljivih fenola, RA i CAF te na oksidacijski/antioksidacijski status kosmatog korijenja ukrasne koprive. Analiza semi-kvantitativnim RT-PCR-om pokazala je prisutnost transkripta gena *crypt* u *crypt*-linijama tretiranim etanolom, dok je razina ekspresije β -kriptogaina ovisila o koncentraciji primijenjenog etanola. Rezultati dobiveni bioinformatičkom analizom aminokiselinskog slijeda β -kriptogaina i SDS-PAGE analizom izvanstaničnih proteina ukazuju na vjerojatnost da se endogeno sintetiziran β -kriptogein secernira van stanice te svoj učinak ostvaruje preko interakcije s receptorom na plazma membrani.

Za određivanje učinka kriptogeina na sintezu fenolnih spojeva, ekspresija β -kriptogeina bila je kontrolirana dodatkom 1% -tnog i 2% -tnog etanola 4. dan subkulture. Transgeno korijenje za analizu uzorkovano je neposredno prije tretmana, zatim 7., 14. i 21. dan nakon tretmana etanolom. Na rast transgenog korijenja imali su utjecaj i etanol *per se* i β -kriptogein. Iako je etanol inhibirao rast korijenja, njegov negativni učinak umanjila je ekspresija gena *crypt*. Tijekom indukcijskog perioda ekspresija β -kriptogeina, inducirana etanolom, uzrokovala je značajno smanjenje sadržaja ukupnih topljivih fenola i RA u linijama transgenog korijenja, ovisno o koncentraciji primijenjenog etanola. S druge strane, ekspresija β -kriptogeina u transgenom korijenju bila je povezana sa stimulacijom sekrecije ukupnih topljivih fenola, RA i kavene kiseline u tekuću hranjivu podlogu. Sposobnost kosmatog korijenja da secernira značajne sekundarne metabolite u tekuću hranjivu podlogu može reducirati velike troškove procesa izolacije i pročišćavanja metabolita jer ne dolazi do uništavanja vrijedne biomase. Dobiveni rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu β -kriptogeina u regulaciji sekrecije značajnih sekundarnih metabolita.

Za određivanje učinka β -kriptogeina na oksidacijsko/antioksidacijski status transgenog korijenja, ekspresija β -kriptogeina bila je kontrolirana dodatkom 0.1% -tnog i 1% -tnog etanola 4. dan subkulture. Transgeno korijenje za analizu uzorkovano je neposredno prije tretmana, zatim 3., 7. i 14. dan nakon tretmana etanolom. Kao pokazatelji oksidacijskog stresa mjerene su količine vodikova peroksida (H_2O_2) i produkata lipidne peroksidacije (MDA), dok je antioksidacijski status određen mjerenjem specifične aktivnosti NADPH-oksidaze (NOX), superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT) i gvajakol peroksidaze (GPOD). Dobiveni rezultati ukazuju na odsutnost oksidativnog stresa u tretiranom transgenom korijenju. Ekspresija β -kriptogeina inducirana etanolom, uzrokuje povećanje aktivnosti NOX i antioksidacijskih enzima – SOD, CAT i GPOD u transgenom korijenju (O3 i O6), što upućuje na značajnu ulogu endogeno sintetiziranog β -kriptogeina u povećanju antioksidacijskog statusa transgenog korijenja ukrasne koprive. Uloga endogeno sintetiziranog β -kriptogeina u povećanju antioksidativnog statusa bi mogla doprinijeti otpornosti biljaka protiv patogena i drugih okolišnih stresnih čimbenika.

9. SUMMARY

Coleus blumei Benth is known as a medicinal plant due to a high content of phenolic compounds. Recently, public and scientific interest in phenolics has increased greatly because of health-promoting effects of this group of substances. Due to pharmacological importance of phenolic compounds, different methods are tested for enhancing their production and revealing their physiological roles. The property of biotic elicitors to induce plant defence response was used as a strategy for enhancing production of commercially important compounds in plant *in vitro* cultures. Also, elicitors have been used to improve plant resistance to pathogens and to some environmental stresses. One of the significant plant defense responses involves the production of reactive oxygen species (ROS). ROS are involved in different signaling pathways for defense mechanisms, but their uncontrolled accumulation can lead to oxidative stress. To prevent harmful effects of ROS, plants have evolved complex anti-oxidative defense mechanisms that involve induction of anti-oxidative enzymes. Proteinaceous elicitor secreted by phytopathogenic oomycete *Phytophthora cryptogea*, β -cryptogein, induces hypersensitive response and systemic acquired resistance in plants against some pathogens. The aim of this study was to generate *C. blumei* hairy roots, carrying *crypt* transgene under the control of alcohol inducible promoter. Through controlled expression of β -cryptogein, pathogen attack could be mimicked. The effects of endogenously synthesized β -cryptogein protein on phenolic compounds synthesis and antioxidative status of the transgenic roots were tested. For *C. blumei* transformation, *A. rhizogenes* strain A4 harboring pBinSRNA-CRYPT binary vector has been used. Fragments of genes *crypt* and *orf13* in obtained transgenic roots were amplified by PCR, confirming genetic transformation. For further experiments three hairy root lines, carrying *crypt* gene, were selected (O3, O5, O6). Line OA4 (without the *crypt* gene) was used to test the effect of different concentrations of ethanol *per se* on growth index, RA, CAF, soluble phenolic content and oxidative/antioxidative status in *C. blumei* hairy roots. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed presence of *crypt* transcripts in ethanol-treated *crypt*-lines. According to these results, expression level of *crypt* gene could be controlled by ethanol concentration. Results obtained by the protein localization prediction software tools and by the SDS-PAGE analysis of extracellular proteins suggest that endogenously synthesized β -cryptogein might be secreted, and consequently recognized by the receptors on the plasma membrane.

For the analysis of the phenolics synthesis, the expression of β -cryptogein in *C. blumei* hairy roots, was controlled by application of 1% and 2% ethanol at the 4th day of subculture. Transgenic roots and growth medium, for the analysis, were harvested before

the treatment and on the 7th, 14th and 21st day after ethanol treatment. Both, cryptogein and ethanol influenced the growth of transgenic root lines. Although ethanol had negative effect on the growth, its impact was counteracted to some extent by the expression of *crypt*. During induction period, ethanol-induced expression of β -cryptogein caused significant decrease of soluble phenolics and RA in hairy root lines mainly in a concentration-dependent manner. On the other hand, expression of β -cryptogein in transformed root lines was associated with a stimulation of phenolics secretion into the culture medium. The ability of hairy roots to secrete important secondary metabolites to the culture medium could reduce the overall costs of harvesting procedure for product recovery without destruction of valuable biomass. These data suggest that inducible expression of β -cryptogein might be a potential regulatory factor for phenolics secretion from the roots.

For the analysis of the oxidative/antioxidative status, the expression of β -cryptogein in *C. blumei* hairy roots was controlled by application of 0.1% and 1% ethanol at the 4th day of subculture. Transgenic roots for analysis were harvested before the treatment and on the 3rd, 7th and 14th day after ethanol treatment. As an indicator of the oxidative stress, hydrogen peroxide (H₂O₂) and lipid peroxidation product contents (MDA) were estimated, while antioxidative status was determined by measuring NADPH-oxidase (NOX), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and guaiacol peroxidase (GPOD) activities. Obtained results confirmed the absence of oxidative stress in treated tissues. Ethanol-induced expression of β -cryptogein in transgenic roots caused significant increase in NOX and antioxidative enzyme activities - SOD, CAT, GPOD. Increased antioxidative status could provide enhance resistance against pathogens and other environmental stresses.

10. ŽIVOTOPIS

Rosemary Vuković rođena je 16. lipnja 1981. godine u Fairfieldu, u Australiji. Nakon završene Opće gimnazije u Županji upisala je Pedagoški fakultet u Osijeku, smjer biologija i kemija. Diplomirala je na Odjelu za biologiju i Odjelu za kemiju 2006. godine te stekla zvanje diplomiranog profesora biologije i kemije. Poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti upisala je 2006. godine na Sveučilištu J. J. Strossmayer u Osijeku.

Početak rujna 2006. godine zaposlila se u OŠ Dr Stjepan Ilijašević u Oriovcu kao nastavnik biologije i kemije, a od 1. svibnja 2007. zaposlena je na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayer u Osijeku kao asistent. Od 2009. do danas radi kao suradnik na znanstveno istraživačkom projektu MZT-a „Nutrienti i razvoj plutajućih makrofita i alga u Istočnoj Hrvatskoj“, glavnog istraživača izv. prof. dr. sc. Janje Horvatić. U nastavnom radu sudjelovala je u izvođenju vježbi iz kolegija Preddiplomskog i Diplomskog studija biologije: Biokemija 1, Biokemija 2, Biokemija 3, Molekularna biologija, Eksperimentalne biokemijske tehnike i Enzimska kinetika te u izvođenju seminara iz Biokemije 1 na Preddiplomskom studiju kemije.

Rosemary Vuković objavila je jedan znanstveni rad citiran u CC bazi podataka kao prvi autor, jedan stručni rad kao koautor te je sudjelovala na 8 međunarodnih skupova kao prvi autor ili koautor.

Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju i Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

11. POPIS RADOVA

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

Vuković, Rosemary; Bauer, Nataša; Ćurković-Perica, Mirna. Genetic elicitation by inducible expression of β -cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. // *Plant science*. 199-200 (2013); 18-28.

Stručni radovi

Majić, Senka; **Vuković, Rosemary**; Šter, Anamarija; Has-Schön, Elizabeta. Enzimatsko određivanje glikolitičkog potencijala – pouzdana metoda za predviđanje kvalitete mesa. *Krmiva*, 2010; 52:353-358.

Sažeci u zbornicima skupova

Štolfa, Ivna; Stanisavljević, Aleksandar; Marić, Sanela; Marić, Seada; **Vuković, Rosemary**; Katanić, Zorana; Žuna Pfeiffer, Tanja; Špoljarić, Dubravka; Tihana, Teklić. The impact of environmentally friendly postharvest treatments on the antioxidant activity of strawberry fruits during storage // Zbornik sažetaka 48. hrvatskog i 8. međunarodnog simpozija agronoma / Marić, Sonja, Lončarić, Zdenko (ur.). Dubrovnik: Poljoprivredni fakultet, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2013. 88-89 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Vuković, Rosemary; Bauer, Nataša; Ćurković-Perica, Mirna. Expression of β -cryptogein stimulates rosmarinic acid secretion from the *Coleus blumei* transgenic roots // *5th Croatian Congress of Microbiology with International Participation, book of abstracts* / Černi, Silvija; Šeruga Musić, Martina; Škorić, Dijana (ur.). Zagreb: Hrvatsko mikrobiološko društvo, 2012. 57-57 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Vuković, Rosemary; Bauer, Nataša; Štolfa, Ivna; Mataković, Lavinija; Has-Schön, Elizabeta; Ćurković-Perica, Mirna. Influence of β -cryptogein on antioxidant status of *Coleus blumei* hairy roots. Zbornik sažetaka (11. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem), Jelaska S.D; Klobučar G.I.V; Šerić Jelaska L; Leljak Levanić D; Lukša Ž. (ur.), Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2012. 38-39. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Vuković Rosemary, Štolfa Ivna, Žuna Pfeiffer Tanja, Špoljarić Dubravka, Ćavar Ivana, Krstin Ljilja. Antioxidative response of Stevia leaves to low temperature treatment. Abstract Book of 6th Central European Congress on Food, Lević J. (ur.), Novi Sad:

University of Novi Sad, Institute of Food Technology, 2012. 155. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Špoljarević Marija, Štolfa Ivna, **Vuković Rosemary**, Agić Dean, Lisjak Miroslav, Andrić L., Teklić Tihana. Vigor sjemena soje pod utjecajem abiotskog stresa. Zbornik nradova 47. hrvatskog i 7. međunarodnog simpozija agronoma, Pospišil M. (ur.), Zagreb: Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2012. 77-78. (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Vuković, Rosemary, Majić, Senka, Pavličević, Jerko, Galović, Dalida, Has-Schön, Elizabeta, Bogut, Ante; Bogut, Ivan. Heavy metal distribution in tissues of three fish species inhabiting hydroaccumulation Mostar, Bosnia and Herzegovina // *Book of Abstracts / Zrinka, Kovarik ; Jadranka, Varljen (ur.)*. Rijeka: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2010. 152-152. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Vuković, Rosemary; Suknović, Dragica; Wagner, Jadranka; Majić, Senka; Has-Schön, Elizabeta. Utjecaj intenziteta i trajanja pušenja na derivate hemoglobina u krvi pušača iz Osijeka // *Zbornik Sažetaka / Besendorfer, Višnja; Kopjar, Nevenka; Vidaković-Cifrek, Željka; Tkalec, Mirta; Bauer, Nataša; Lukša, Žaklin (ur.)*. Zagreb: Hrvatsko biološko društvo, 2009. 267-268. (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)

Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ivan; **Vuković, Rosemary**; Galović, Dalida. Age – related accumulation of heavy metals in tissues of Carp and Catfish from Svitava lake (Bosnia and Herzegovina) // *Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with International Participation, Book of Abstracts / Strelec, Ivica; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.)*. Osijek: Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008. 94-94. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)